

Untersuchungen zur Modifikation von Aquaporinen aus *Nicotiana tabacum*

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Hochschule Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl. Biol. Matthias Fischer

aus

Freiburg im Breisgau

Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 15.10.2007

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2007

Darmstadt 2007

D17

Mein Dank gilt...

Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff für die Bereitstellung des Themas, sein Vertrauen, seine Unterstützung und Hilfe während der Arbeit.

Prof. Dr. Gerhard Thiel für die Bereitschaft sich als Gutachter meiner Arbeit zur Verfügung zu stellen

Dr. Adam Bertl für seine Unterstützung an der „Stopped-Flow“ und die ständige Diskussionsbereitschaft

der gesamten Arbeitsgruppe Kaldenhoff für ihre Hilfe und die gute Laune im Labor

Dr. Jeffrey Brodsky (University of Pittsburgh, USA) für die Übersendung des *Saccharomyces cerevisiae*-Stammes SY-1

allen Korrekturlesern

meinen Eltern, Großeltern und Verwandten

Christiane

I	EINLEITUNG	1
1	Aquaporine	1
1.1	Phylogenetische Einteilung und subzelluläre Lokalisation pflanzlicher Aquaporine	2
1.2	Molekularer Mechanismus der Leitfähigkeit und Selektivität von pflanzlichen Aquaporinen	3
1.3	Modulation der Aktivität pflanzlicher Aquaporine	4
1.4	Systeme zur Charakterisierung pflanzlicher Aquaporine	6
2	Ziele der Arbeit	7
II	ERGEBNISSE	9
1	Molekulare Grundlagen für die H₂O-Leitfähigkeit von NtPIP2;1	9
1.1	Identifizierung der Topologie von NtAQP1 und NtPIP2;1	10
1.2	Der N-Terminus von NtPIP2;1	11
1.2.1	Generierung der chimären nP2A1-cDNA	11
1.2.2	„Western-Blot“-Analysen des nP2A1-Proteins	12
1.2.3	Bestimmung der Größe von SY1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Protoplasten	13
1.2.4	Funktionelle Analyse des nP2A1-Proteins	14
1.3	Loop B und E von NtPIP2;1	15
1.3.1	Generierung der A1pP2-cDNA	16
1.3.2	„Western-Blot“-Analysen des A1pP2-Proteins	16
1.4	Die C-terminale Hälfte von NtPIP2;1	17
1.4.1	Generierung der cA1P2-cDNA	17
1.4.2	„Western-Blot“-Analysen des cA1P2-Proteins	18
2	Regulation der PIP-Aktivität: Heteromerisierung	20
2.1	Heteromerisierung von NtAQP1 und NtPIP2;1	20
2.2	Herstellung von künstlichen Homo- und Heterotetrameren	20
2.3	„Western-Blot“-Analysen der künstlichen Tetramere	21
2.4	Zeitlicher Verlauf der Tetramer-Expression	22
2.5	Bestimmung des P _f -Wertes der künstlichen Heterotetramere	23
3	Regulation der Aquaporin-Aktivität: Aquaporin-„Gating“	25
3.1	Expression der NtAQP1- und NtPIP2;1-Mutanten	27
3.2	Bestimmung des zytosolischen pH-Wertes von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Protoplasten	28
3.3	Bestimmung der P _f -Werte für NtPIP2;1 und NtPIP2;1-Mutanten exprimierende <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Protoplasten	29

II	Inhalt
3.4	Behandlung der NtPIP2;1-exprimierenden Hefezellen mit Phosphatase- und Kinase-Inhibitoren 32
3.5	„Gating“ von NtAQP1 33
III	DISKUSSION 35
1	Strukturelle Voraussetzungen für die Wasserleitung durch PIP 35
1.1	Weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der strukturellen Voraussetzung der H ₂ O-Leitung von PIP 39
2	Regulation der H₂O-Leitfähigkeit: Heteromerisierung von PIP-Aquaporinen 41
2.1	Weiterführende Arbeiten zur Analyse der Modifikation der H ₂ O-Leitung von PIP durch Heteromerisierung 43
3	Regulation der H₂O-Leitfähigkeit: Aquaporin-„Gating“ 45
3.1	Weiterführende Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation der Funktion von pflanzlichen PIP 52
IV	MATERIAL UND METHODEN 53
1	Verwendete Organismen und Plasmide 53
1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme 53
1.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme 53
1.3	Verwendete Plasmide 53
1.3.1	Plasmide zur Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 53
1.3.2	Gateway- und Klonierungsplasmide 54
1.4	Synthetische Oligonukleotide 54
1.4.1	Primer für künstliche Heterotetramere 54
1.4.2	Primer für SOE-PCR 55
1.4.3	Primer für die Mutagenese von NtAQP1 und NtPIP2;1 56
1.4.4	Primer für die Klonierung mit dem Gateway®-System 56
1.4.5	Primer für Sequenzierungen 57
2	Medien 57
2.1	Medien zur Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 57
2.2	Medien zur Anzucht und Transformation von <i>Escherichia coli</i> 58
2.3	Medien zur Protoplastierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 58
2.4	Medien zur Messung der Wasserpermeabilität der Plasmamembran von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mittels „Stopped-Flow“-Spektrometrie 59

Inhalt	III
3 Verfahren mit <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	59
3.1 Kultivierung von <i>E.coli</i>	59
3.2 Erstellen von Dauerkulturen von <i>E.coli</i>	59
3.3 Transformation von <i>E.coli</i> nach der CaCl ₂ /Hitzeschock-Methode	59
3.4 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E.coli</i>	60
4 Verfahren mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	61
4.1 Kultivierung von <i>S.cerevisiae</i>	61
4.2 Erstellen einer Dauerkultur von <i>S.cerevisiae</i>	61
4.3 Biolistische Transformation von <i>S.cerevisiae</i>	61
4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S.cerevisiae</i>	61
4.5 Protoplastierung von <i>S.cerevisiae</i>	62
4.6 Bestimmung der Größe von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Protoplasten	63
4.7 Messung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten (P_f) der Plasmamembran von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mittels „Stopped-Flow“-Spektrometrie	63
4.7.1 „Stopped-Flow“-Spektrometrie	63
4.7.2 Aufnahme von Schwellungskinetiken von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Protoplasten	65
4.7.3 Berechnung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten (P_f) der Plasmamembran von <i>S.cerevisiae</i> -Protoplasten	65
4.8 Gesamtprotein-Präparation von <i>S.cerevisiae</i>	66
4.9 Präparation von Membranproteinen von <i>S.cerevisiae</i>	66
4.10 Bestimmung des zytosolischen pH von <i>S.cerevisiae</i> unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Bisacetat	67
4.10.1 Kalibrierung des pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein	69
4.10.2 Bestimmung des zytosolischen pH-Wertes von <i>S.cerevisiae</i>	70
5 Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	71
5.1 Methoden zur Bearbeitung von DNA	71
5.1.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	71
5.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel	71
5.1.3 Elution von DNA aus einem Agarosegel	72
5.2 Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR)	72
5.3 Fusion von DNA Fragmenten durch „Splicing by overlap extension“ (SOE)-PCR	72
5.4 Klonierung von DNA	73
5.4.1 T/A-Klonierung von PCR Produkten	73
5.4.2 Klonierung von PCR Produkten mit dem Gateway®-System	74
5.4.3 Ligation von DNA	77
5.5 Gerichtete Mutagenese von DNA Sequenzen	77
5.6 Sequenzieren von DNA Fragmenten	77

IV	Inhalt
6 Verfahren mit Proteinen	78
6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	78
6.2 Coomassie-Färbung von Proteinen	79
6.3 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford	79
6.4 „Western-Blot“-Analysen von Proteinen	80
6.4.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran	80
6.4.2 Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz	80
V ZUSAMMENFASSUNG	83
VI LITERATURVERZEICHNIS	85
VII ANHANG	97
1 Tabellarische P_r-Werte	97
2 Sequenzen	98
2.1 nP2A1-DNA-Sequenz	98
2.2 cA1P2-DNA-Sequenz	98
2.3 A1pP2-DNA-Sequenz	99
2.4 NtPIP2;1_S118A-Proteinsequenz	99
2.5 NtPIP2;1_S277A-Proteinsequenz	99
2.6 NtPIP2;1_S118/277A-Proteinsequenz	100
2.7 NtPIP2;1_H196A-Proteinsequenz	100
2.8 NtPIP2;1_H196A/S277A-Proteinsequenz	100
2.9 NtAQP1_S129A-Proteinsequenz	100
3 Abkürzungsverzeichnis	101
4 Ein-, bzw. Dreibuchstabencode der Aminosäuren	102

I Einleitung

1 Aquaporine

Die Vorstellung, dass Wasser ausschließlich durch Diffusion über biologische Membranen gelangt, änderte sich, nachdem für viele verschiedenen Membrantypen eine unterschiedliche Durchlässigkeit für Wasser festgestellt wurde. Bei manchen Membranen war die Leitfähigkeit für H_2O so hoch, dass sie nicht nur durch Diffusion zu erklären war (Hevesy *et al.*, 1935). Nach dieser Erkenntnis dauerte es dennoch ca. 50 Jahre bis das erste wasserleitende Kanalprotein aus der Membran menschlicher Erythrozyten isoliert wurde (Denker *et al.*, 1988; Preston and Agre, 1991).

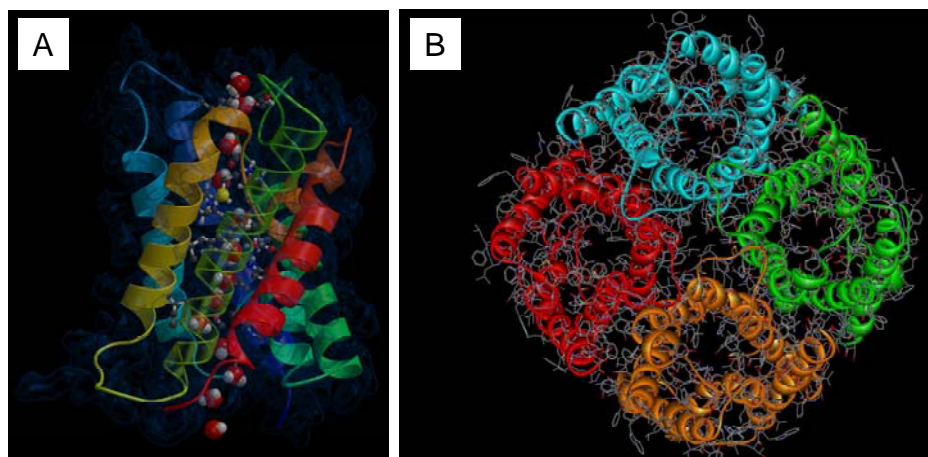


Abbildung I-1 (A) molekularer Aufbau eines Aquaporin Monomers in der Seitenansicht. (B) Aquaporin-Tetramer in der Aufsicht

Mittlerweile konnten Aquaporine aus nahezu jedem Organismus beschrieben werden (Park and Saier, 1996). Gemeinsam ist allen Aquaporinen ihr molekularer Aufbau. In Membranen wurden Aquaporin-Tetramere nachgewiesen, wobei jedes Monomer einen Kanal zur Leitung von H_2O bereitstellt (Abbildung I-1B) (Fu *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2000). Ein Monomer ist aufgebaut aus sechs transmembranen Helices, die durch drei extra- und zwei intrazelluläre Loops verbunden sind. N- und C-Terminus sind im Zytosol lokalisiert (Abbildung I-1A). Der eigentliche Kanal eines Aquaporins wird durch zwei Halbhelices in Loop B und E gebildet, die von der intra- bzw.

extrazellulären Seite in die Membran ragen. In beiden Halbhelices findet man eine für Aquaporine charakteristische hoch konservierte Aminosäuresequenz aus Asparagin (N), Prolin (P) und Alanin (A), die dementsprechend als NPA-Motiv bezeichnet wird (Borgnia *et al.*, 1999).

1.1 Phylogenetische Einteilung und subzelluläre Lokalisation pflanzlicher Aquaporine

Während man im menschlichen Organismus 13 verschiedene Aquaporin-Isoformen identifizieren konnte, zeigte sich in pflanzlichen Organismen wie *Arabidopsis thaliana* eine noch höhere Diversität mit bis zu 35 Aquaporin-Homologen (Johanson *et al.*, 2001; Agre *et al.*, 2002). Nach phylogenetischen Untersuchungen wurden die pflanzlichen Aquaporine in vier Gruppen eingeteilt, die Plasmamembran-intrinsischen Proteine (PIP), die in zwei Unterfamilien PIP1 und PIP2 gegliedert werden, Tonoplast-intrinsischen Proteine (TIP), Nodulin26-ähnliche-intrinsische Proteine (NIP) und kleine basische intrinsische Proteine (SIP, Small basic intrinsic proteins) (Chaumont *et al.*, 2001; Johanson *et al.*, 2001; Johanson and Gustavsson, 2002).

Die Bezeichnung der Mitglieder der PIP und TIP Unterfamilien erfolgte ursprünglich aufgrund ihrer Lokalisation in pflanzlichen Zellen. Zahlreiche Untersuchungen zeigten inzwischen eine Verteilung der Mitglieder der beiden Proteinfamilien in nahezu allen intrazellulären Membranen (Otto and Kaldenhoff, 2000; Quigley *et al.*, 2002; Kaldenhoff and Fischer, 2006). NIP werden durch ihre hohe Sequenzhomologie zu Nodulin26 klassifiziert (Wallace *et al.*, 2006). Nodulin26 konnte aus der Peribakteroid-Membran von symbiotischen Knöllchenbakterien in den Wurzeln der Sojabohne isoliert werden und ist mittlerweile eines der am besten charakterisierten Aquaporine. In Pflanzen, die keine Symbiosen mit Bakterien an ihren Wurzeln eingehen, findet man NIP sowohl in der Plasmamembran, als auch in intrazellulären Membranen (Ma *et al.*, 2006; Mizutani *et al.*, 2006; Takano *et al.*, 2006). Die SIP repräsentieren die kleinste und jüngste Unterfamilie der Aquaporine. Sie wurden durch eine Genom-Sequenzanalyse entdeckt und sind hauptsächlich im ER von Pflanzenzellen lokalisiert (Johanson and Gustavsson, 2002; Ishikawa *et al.*, 2005).

1.2 Molekularer Mechanismus der Leitfähigkeit und Selektivität von pflanzlichen Aquaporinen

Anfänglich galten Aquaporine als ausschließlich wasserleitende Kanalproteine mit hoher Selektivität und Effizienz. So zeigte das humane AQP1-Monomer eine Leitfähigkeit von 10^9 Molekülen H_2O pro Sekunde (Fujiyoshi *et al.*, 2002). Zudem präsentierten sich Aquaporine als strikt undurchlässig für Protonen. Diese Eigenschaft ist mit Sicht auf die für viele Stoffwechselvorgänge sehr wichtigen Protonengradienten über Membranen von großer Bedeutung. Der molekulare Mechanismus der Selektivität von Aquaporinen konnte anhand der Kristallstruktur des menschlichen AQP1 und bakteriellen GlpF aufgeklärt werden (de Groot and Grubmüller, 2001; Sui *et al.*, 2001; de Groot *et al.*, 2003). Demzufolge wirken der Bereich um die NPA-Motive und eine tetraedrische Anordnung von vier Aminosäuren (Ar/R-Region) am extrazellulären Eingang des Kanals als Selektivitätsfilter für die Leitung eines Substrates durch ein Aquaporin.

Nach mehrfachen Untersuchungen zur Leitfähigkeit können Aquaporine mittlerweile als multifunktionale Kanäle betrachtet werden. So zeigen einige pflanzliche PIP in funktionellen Tests eine Leitfähigkeit für Glycerin oder Harnstoff. Bei näherer Betrachtung der PIP-Unterfamilien offenbarten sich grundlegend verschiedene Leitfähigkeitscharakteristiken für PIP1- bzw. PIP2-Mitglieder. Während PIP1-Proteine nahezu undurchdringlich für H_2O scheinen, dafür aber eine Leitfähigkeit für kleine ungeladene Moleküle (Glycerin, Harnstoff) bedingen, vermitteln PIP2-Aquaporine eine hohe H_2O -Leitfähigkeit über Membranen (Biela *et al.*, 1999; Dean *et al.*, 1999; Gerbeau *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 2006). Auch für einige NIP und TIP konnten zusätzlich zu H_2O weitere Substrate wie Formamid, Ammonium oder Glycerin identifiziert werden (Dean *et al.*, 1999; Gerbeau *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2005). Von physiologischer Bedeutung für die Pflanze war allerdings erst die Leitfähigkeit einiger Aquaporin-Isoformen von Kohlenstoffdioxid (CO_2) oder Ammoniak (NH_3) (Uehlein *et al.*, 2003; Holm *et al.*, 2005; Loque *et al.*, 2005). Der molekulare Mechanismus der Leitung von Gasen durch Aquaporine konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Neue Studien an einem TIP aus Weizen legen eine von H_2O verschiedene Leitbahn für NH_3 durch das Protein nahe (Bertl and Kaldenhoff, 2007). Der Einsatz des Aquaporin-

Inhibitors Quecksilber vermochte die Leitung von Wasser zu blockieren, nicht jedoch die von NH_3 .

1.3 Modulation der Aktivität pflanzlicher Aquaporine

Die Bewältigung verschiedener Stresssituationen (Trockenheit, Hitze, Überflutung, etc.) bedingt die Möglichkeit für Pflanzen, die H_2O -Permeabilität von Membranen und Membranbestandteilen zu modulieren.

Mehrere Studien deckten verschiedenen Regulationsmechanismen auf, die die Funktion von Aquaporinen direkt (z.B. posttranslationale Modifikation) oder indirekt (z.B. durch ihre Umverteilung) beeinflussten.

Mittels *in vivo* Experimenten mit radioaktiv markiertem Phosphat, massenspektroskopischen Untersuchungen und Phosphoprotein-spezifischen Antikörpern wurde nachgewiesen, dass einige Aquaporine der PIP-, TIP- und NIP-Unterfamilien in der Pflanze phosphoryliert vorliegen (Weaver *et al.*, 1991; Johnson and Chrispeels, 1992; Johansson *et al.*, 1998; Guenther *et al.*, 2003; Santoni *et al.*, 2003). Eine Regulation der Funktion durch Phosphorylierung zeigte sich bei unabhängigen Versuchen mit drei verschiedenen Aquaporinen (PvTIP3;1, Nodulin26, SoPIP2;1) im *Xenopus laevis* Oozyten-System (Maurel *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 1998; Guenther *et al.*, 2003). Unterdrückung bzw. Stimulierung der Aktivität von Kinasen und Phosphatasen veränderte hierbei die H_2O -Leitfähigkeit der Plasmamembran der Oozyten. Die Mutation der Erkennungs-Sequenzen für die Kinasen bzw. Phosphatasen in den Aquaporinen setzten die Effekte der Inhibitoren und Aktivatoren außer Kraft.

Nach der Identifikation von Kalzium-abhängigen Proteinkinasen konnte die Modifikation der H_2O -Leitfähigkeit von Aquaporinen mit intrazellulären Signalkaskaden verknüpft werden (Johnson and Chrispeels, 1992; Johansson *et al.*, 1996; Sjovald-Larsen *et al.*, 2006). Eine Steigerung der zytosolischen Kalzium-Konzentration wurde bei Pflanzen als Reaktion auf Wasser- oder Hitzestress beobachtet (Xiong *et al.*, 2002). Bisher ist noch nicht vollständig geklärt, ob die Modulation der H_2O -Leitfähigkeit vollständig auf der indirekten Regulation durch Kinasen beruht, oder

ob auch die Interaktion von freiem Kalzium mit strukturellen Domänen eines Aquaporins einen regulativen Mechanismus darstellt (Gerbeau *et al.*, 2002).

Infolge Sauerstoffmangels konnte in Wurzelzell-Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* mit der Erhöhung der intrazellulären Protonen-Konzentration eine Reduktion der H₂O-Leitfähigkeit der Plasmamembran beobachtet werden (Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Die Mutagenese von Aminosäuren die für eine Protonierung im Zytosol zugänglich waren, führte bei einem PIP aus *Arabidopsis thaliana* zur Aufhebung der pH-Abhängigkeit der H₂O-Leitfähigkeit. In anderen Organen und Geweben der Pflanze außerhalb der Wurzeln gibt es bisher noch keine Hinweise auf eine Regulation der H₂O-Leitfähigkeit von Membranen durch Veränderungen im intrazellulären pH-Wert.

Bei der Aufklärung der atomaren Struktur eines PIP aus Spinat (SoPIP2;1) wurde das Aquaporin in einer offenen und geschlossenen Konformation, durch die eine Leitung von H₂O-Molekülen nicht möglich ist, kristallisiert (Kukulski *et al.*, 2005; Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). Anschließend modellierten die Autoren einen Regulationsmechanismus, der auf posttranslationaler Phosphorylierung und Protonierung des Proteins basiert (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). Demzufolge ist eine Wasserleitung durch das Protein nach der Phosphorylierung zweier Serin-Aminosäuren in Loop B und am C-Terminus möglich. Die Dephosphorylierung der beiden Aminosäuren vermittelt eine Verlagerung eines intrazellulären Loops über den zytosolischen Ausgang des Kanals. In dieser Position bildet der Loop eine Barriere für die Wasserleitung. Während eines alternativen Mechanismus wird die Verlagerung des Loops durch die Protonierung einer Histidin-Aminosäure induziert. Da der Loop bei diesen Mechanismen wie ein Tor den Eingang des Kanals öffnet oder verschließt, spricht man hier von einem „Gating“- (Tor, engl. „gate“) Mechanismus. Aufgrund des hohen Grades an konservierten Aminosäuren, die an diesem Mechanismus beteiligt sind, wurde das „Gating“-Model als allgemein gültig für alle pflanzlichen PIP erklärt.

Weitere Arbeiten zur Regulation von Aquaporinen untersuchten die gezielte Umverteilung von Aquaporinen und die Auswirkungen auf die H₂O-Permeabilität von Membranen (Harvengt *et al.*, 2000; Fetter *et al.*, 2004; Temmei *et al.*, 2005). Eine Umverteilung eines PIP1 aus Mais konnte nach der gleichzeitigen Expression mit einem PIP2 in *Xenopus*-Oozyten beobachtet werden. Während bei individueller Expression

das PIP1 hauptsächlich in intrazellulären Membranen lokalisiert war, verlagerte sich das Vorkommen bei gleichzeitiger Expression mit dem PIP2 in die Plasmamembran (Fetter *et al.*, 2004). Die Autoren erklärten die Umverteilung mit der Anordnung der PIP1- und PIP2-Monomere in einem Heterotetramer. Die Interaktion von Aquaporin-Isoformen innerhalb eines Heterotetramers sollte demnach die Lokalisation der Proteine und damit die Leitfähigkeit der Membran modulieren.

Bei tierischen Aquaporinen stellt die Stimulus-induzierte Umverteilung einen bedeutsamer Regulationsmechanismus (Brown, 2003). Ein ähnlicher Vorgang im pflanzlichen Organismus, konnte beim Eiskraut (*Mesembryanthemum crystallinum*) nachgewiesen werden (Vera-Estrella *et al.*, 2004). Infolge osmotischen Stresses beobachtete man die Umverteilung eines TIP vom Tonoplast in endosomale Kompartimente. Dieser Prozess wurde durch Hemmstoffe des Vesikel-Transports blockiert und war abhängig von der Glykosylierung des Aquaporins.

1.4 Systeme zur Charakterisierung pflanzlicher Aquaporine

Zur funktionellen Charakterisierung von pflanzlichen Aquaporinen bedient man sich heute heterologer Expressionssysteme wie *Xenopus laevis*-Oozyten (Maurel *et al.*, 1995; Biela *et al.*, 1999; Takano *et al.*, 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (Jahn *et al.*, 2004; Loque *et al.*, 2005; Bienert *et al.*, 2007) oder der Rekonstitution in Proteoliposomen (Dean *et al.*, 1999; Karlsson *et al.*, 2003). Erste Hinweise auf die Selektivität von Aquaporinen liefern zudem Komplementations-Analysen bei *Saccharomyces cerevisiae*-Wachstumstests. Diese Untersuchungen verlangen allerdings noch die direkte Analyse der Leitfähigkeiten an intakten Zellen oder Membran-Präparationen (Jahn *et al.*, 2004; Loque *et al.*, 2005; Bienert *et al.*, 2007). Auch pflanzliche Zellen werden mittlerweile nach der Über-Expression eines Aquaporins für die funktionelle Untersuchung herangezogen (Ding *et al.*, 2004; Santoni *et al.*, 2006). Pflanzliche Expressionssysteme haben den Vorteil, dass sie alle möglichen Cofaktoren und posttranslationale Modifikationen bereitstellen, die für die Funktion von Aquaporinen notwendig sind. Allerdings ist ihre Entwicklung durch den hohen endogenen Aquaporinegehalt und die daraus resultierende hohe Hintergrund-Leitfähigkeit der Membran limitiert.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Aquaporine zur Charakterisierung in *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen exprimiert und funktional im Protoplast-Schwellungstest durch „Stopped-Flow“-Spektrometrie untersucht (Laize *et al.*, 1999; Soveral *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu Experimenten in *Xenopus laevis*-Oozyten, wobei pro Messung eine Zelle analysiert wird, basieren die erhaltenen Daten auf mehreren tausend klonalen *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen.

2 Ziele der Arbeit

Wie oben erwähnt werden die Mitglieder der Plasmamembran-intrinsischen Proteine in zwei phylogenetische Gruppen, PIP1 und PIP2, unterteilt. Trotz einer Sequenzhomologie von ca. 70% zwischen den Mitgliedern der beiden Gruppen und identischen Aminosäure-Sequenzen innerhalb der Selektivitätsfilter, konnte in heterologen Expressionssystemen nur PIP2-Proteinen eine H₂O-Leitfähigkeit nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden das bereits ausführlich beschriebene NtAQP1, als Vertreter der PIP1 (Biela *et al.*, 1999; Otto and Kaldenhoff, 2000; Siefritz *et al.*, 2001; Siefritz *et al.*, 2002; Uehlein *et al.*, 2003) und NtPIP2;1 (PIP2) (Bots *et al.*, 2005), aus *Nicotiana tabacum* untersucht.

Die Ziele der vorgelegten Arbeit waren:

- Identifikation der strukturellen Merkmale, auf denen die unterschiedlichen Leitfähigkeitscharakteristika von NtAQP1 und NtPIP2;1 beruhen
- Analyse der Interaktion von NtAQP1 und NtPIP2;1 in einem Heterotetramer und die Auswirkungen auf die H₂O-Leitfähigkeit
- Überprüfung der Auswirkungen des für SoPIP2;1 postulierten „Gating“-Mechanismus auf die Funktion von NtAQP1 und NtPIP2;1

II Ergebnisse

1 Molekulare Grundlagen für die H₂O-Leitfähigkeit von NtPIP2;1

Die Mitglieder der PIP1- und PIP2-Unterfamilie unterscheiden sich strukturell in der Länge des N- und C-Terminus und funktionell in ihren Leitfähigkeitscharakteristika. Während für PIP2-Aquaporine eine sehr hohe Wasserleitfähigkeit gefunden wurde, zeigten PIP1-Aquaporine in den selben Versuchsanordnungen eine geringe bis keine Durchlässigkeit für H₂O (Chaumont *et al.*, 2000; Moshelion *et al.*, 2002; Bots *et al.*, 2005). PIP1-Proteine wiesen ferner eine Leitfähigkeit für kleine unpolare Moleküle wie Harnstoff oder Glycerin oder Gase, wie CO₂ auf (Biela *et al.*, 1999; Uehlein *et al.*, 2003). Überraschenderweise sind die Proteinsequenzen innerhalb der Selektivitätsfilter in PIP1 und PIP2 Proteinen identisch (Wallace and Roberts, 2004). Für die unterschiedlichen Leitfähigkeiten scheinen demnach andere strukturelle Domänen der Proteine verantwortlich zu sein. NtAQP1 und NtPIP2;1 als Vertreter der PIP1 bzw. PIP2 in *Nicotiana tabacum* zeigten in funktionellen Tests die oben beschriebenen verschiedenen Leitfähigkeiten. Während NtPIP2;1-exprimierende *Xenopus* Oozyten eine hohe Leitfähigkeit der Plasmamembran für H₂O aufwiesen (Bots *et al.*, 2005), konnte für NtAQP1 eine Leitfähigkeit für Glycerol und CO₂ gezeigt werden (Biela *et al.*, 1999; Uehlein *et al.*, 2003). Im Folgenden sollten durch Generierung von chimären Proteinen aus NtAQP1 und NtPIP2;1 die für die ungleichen Leitfähigkeiten verantwortlichen Proteinsequenzen aufgedeckt werden (Abbildung II-1). Die Basis der chimären Proteine bildete die Sequenz von NtAQP1. Durch den Austausch struktureller Domänen mit denen von NtPIP2;1 sollte in anschließenden funktionellen *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplast-Schwelltest und „Stopped-Flow“-Spektrometrie deren Beitrag am Mechanismus der H₂O-Leitung untersucht werden

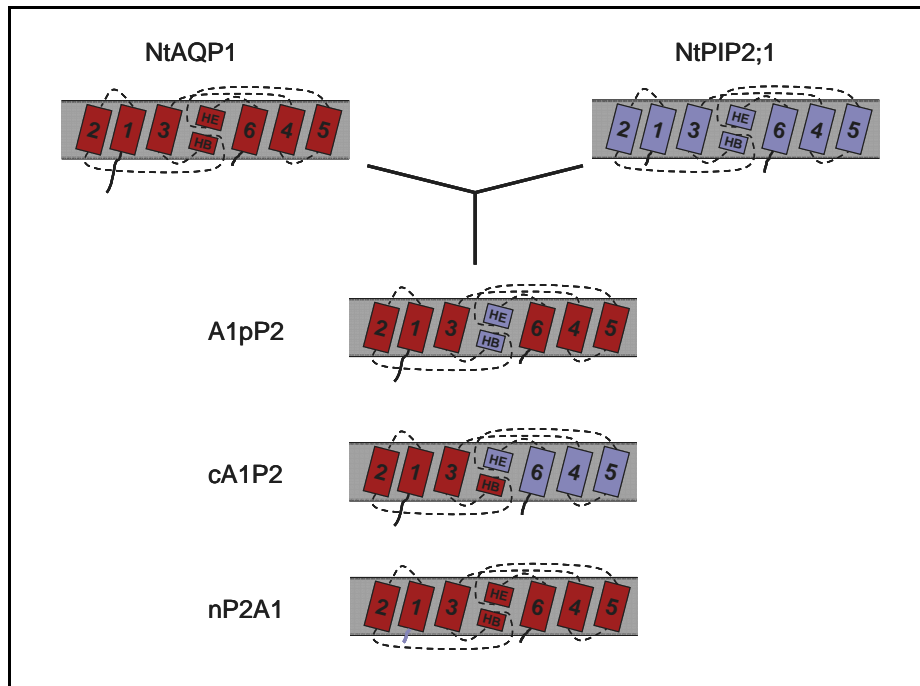


Abbildung II-1 Schematische Darstellung der untersuchten chimären Proteine mit funktionellen Domänen von NtAQP1 und NtPIP2;1.

1.1 Identifizierung der Topologie von NtAQP1 und NtPIP2;1

Durch die Analyse der NtAQP1- und NtPIP2;1-Proteinsequenz mit der Software TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) konnte die Topologie der Proteine aufgeklärt werden (Abbildung II-2 und Abbildung II-3).

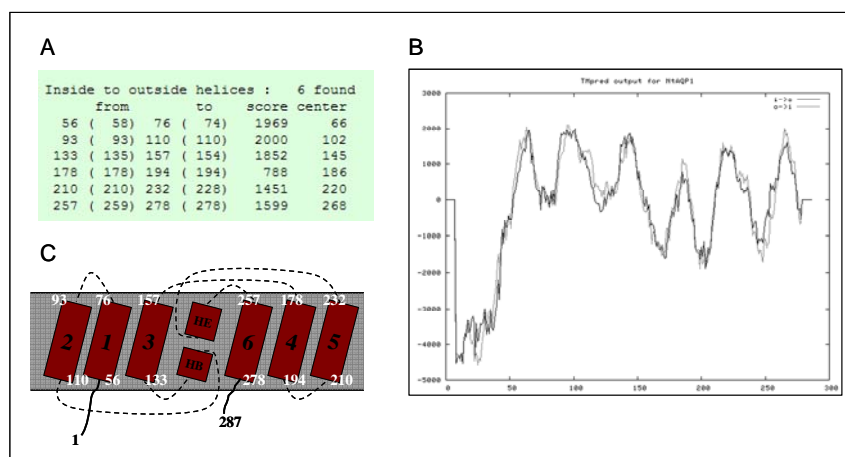


Abbildung II-2 Topologie von NtAQP1. Mit Hilfe der Software TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) wurden die transmembranen Bereiche des Proteins identifiziert (A und B). In C ist ein schematisches Modell von NtAQP1 dargestellt, indem die Aminosäuren am intra- und extrazellulären Ende der Membrandurchspannenden Segmente gekennzeichnet sind

Anhand der erhaltenen Daten konnte der N-Terminus, die Porenregion und die C-terminale Hälfte von NtAQP1 und NtPIP2;1 identifiziert werden und die chimären Proteine generiert werden.

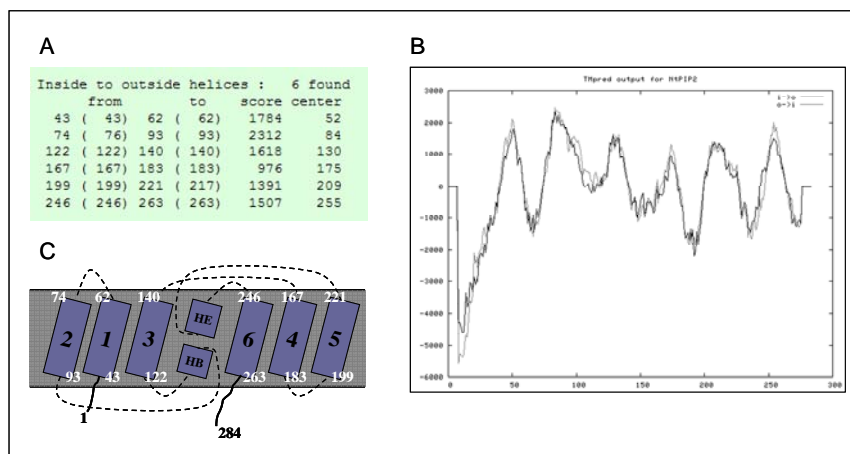


Abbildung II-3 Topologie von NtPIP2;1. Die transmembranen Bereiche von NtPIP2;1 wurden mit Hilfe der Software TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) identifiziert (A und B). In einer schematischen Darstellung des Proteins (C) sind die Nummern der Aminosäuren an den extra - und intrazellulären Enden der Membransegmente gekennzeichnet.

1.2 Der N-Terminus von NtPIP2;1

Im Vergleich zum NtAQP1 ist der N-Terminus des NtPIP2;1-Proteins um 13 Aminosäuren verkürzt. Um die Beteiligung des kürzeren N-Terminus am Mechanismus der Wasserleitfähigkeit durch NtPIP2;1 zu analysieren, wurde der N-Terminus vom NtAQP1 mit dem des NtPIP2;1 ausgetauscht (Abbildung II-1; nP2A1).

1.2.1 Generierung der chimären nP2A1-cDNA

Zur Herstellung der nP2A1-DNA bediente man sich der SOE-PCR-Technik (Abbildung II-4). Nach der Aufreinigung des Fragmentes in einem Agarosegel erfolgte die T/A-Klonierung in den Vektor pCR®2.1. Eine anschließende Sequenzierung ergab die korrekte Basesequenz der nP2A1-cDNA. Durch Restriktion und Ligation wurde das chimäre nP2A1-Gen schließlich in den Hefeexpressionsvektor pYes2/CT kloniert. Nach der Transformation des *Saccharomyces cerevisiae*-Stammes SY1 erfolgte die Selektion auf erfolgreich transformierte SY1-Zellen auf SC+glu(-ura)-Agarmedium. Die erfolgreiche Transformation der auf dem Selektionsmedium wachsenden SY1-Zellen mit dem Expressionskonstrukt wurde durch Plasmid-Präparation und anschließender Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA überprüft.

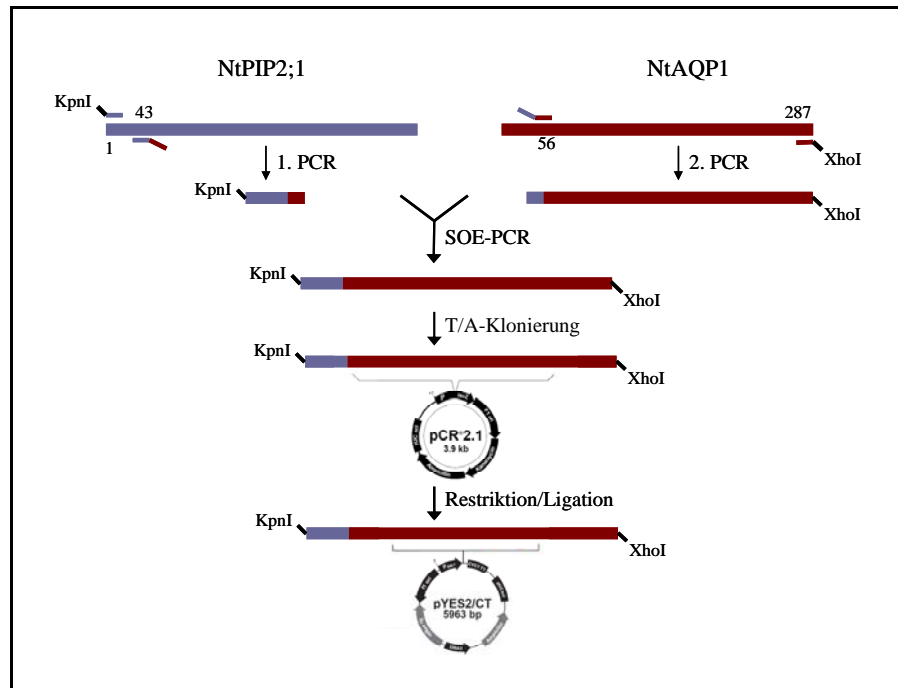


Abbildung II-4 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der nP2A1-cDNA. Durch eine SOE-PCR wurde die chimäre DNA generiert. Durch anschließende Aufreinigung des PCR-Produktes und T/A-Klonierung wurde die nP2A1-cDNA in den Vektor pCR®2.1 ligiert. Unter der Restriktionsspaltung des DNA-Fragmentes und folgender Ligation, wurde das nP2A1 Gen in den Hefeexpressionsvektor pYes2/CT kloniert.

1.2.2 „Western-Blot“-Analysen des nP2A1-Proteins

Nach erfolgreicher Transformation der SY1-Zellen wurde die Expression des nP2A1-Proteins durch die Hybridisierung einer Membranprotein-Präparation mit einem NtPIP2;1-spezifischen Antikörper analysiert. Es erfolgte eine Auftrennung der Membranproteine mittels SDS-PAGE und anschließender Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran. Die folgende Inkubation mit dem spezifischen Antikörper sollte das nP2A1-Protein in der Membran-Fraktion nachweisen. In der Membranproteinfraktion der nP2A1-exprimierenden Hefe konnte ein Protein in dem Größenbereich zwischen 25 und 35kDa detektiert werden, das in der Größenordnung des nP2A1 Protein (26kDa) liegt (Abbildung II-5B).

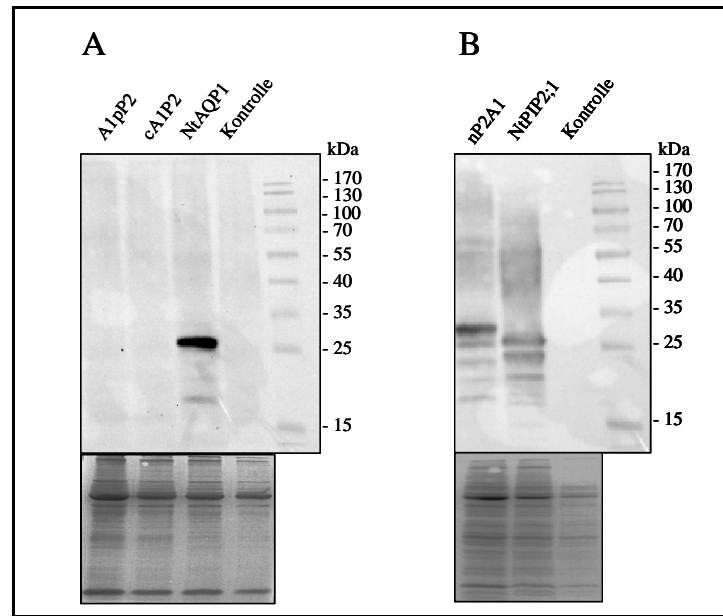


Abbildung II-5 „Western-Blot“ mit Membranproteinen aus *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Membranproteine aus Hefezellen, die die chimären Proteine A1pP2 und cA1pP2 exprimierten. Die Proteine wurden während einer „Western-Blot“-Prozedur mit einem NtAQP1-spezifischen Antikörper hybridisiert. Als positiv- bzw. negativ Kontrolle dienten Membranproteine aus Hefezellen, die das unmodifizierte NtAQP1 (NtAQP1) oder kein zusätzliches Aquaporin (Kontrolle) exprimierten. Das untere Bild zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-Gel. (B) Mit einem NtPIP2;1-spezifischen Antikörper hybridisierte Membranproteine aus nP2A1-exprimierender *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen. Als Kontrolle der „Western-Blot“-Prozedur dienten Präparationen aus NtPIP2;1- und pYES2/CT- (Kontrolle) exprimierender Hefe. Unterhalb ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel dargestellt

1.2.3 Bestimmung der Größe von SY1 *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten

Zur Berechnung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten P_f ist die Kenntnis des Volumens und der Oberfläche der *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten erforderlich. Nach der Bestimmung der Größe der Protoplasten wiesen sie einen Durchmesser von $4,93 \pm 0,11 \mu\text{m}$ ($n=105$) auf (Abbildung II-6).

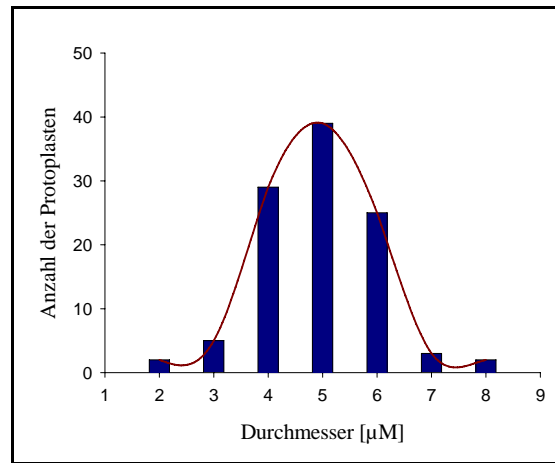


Abbildung II-6 Größenverteilung der *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten. Die Protoplasten wurden nach Resuspendieren in SF-Puffer I im Lichtmikroskop aufgenommen. Mit Hilfe der Software „ImageJ“ wurden die Durchmesser der Protoplasten berechnet.

1.2.4 Funktionelle Analyse des nP2A1-Proteins

Die Funktion des chimären Proteins im Vergleich zum nativen NtAQP1 und NtPIP2;1 wurde im *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplast-Schwelltest und „Stopped-Flow“-Spektrometrie untersucht. Das Schwellen der Protoplasten bei einer Umgebungstemperatur von 10°C wurde durch die Veränderung der Intensität des Streulichtes aufgenommen. In Abbildung II-7A sind die Schwellungskinetiken der Hefeprotoplasten aufgetragen.

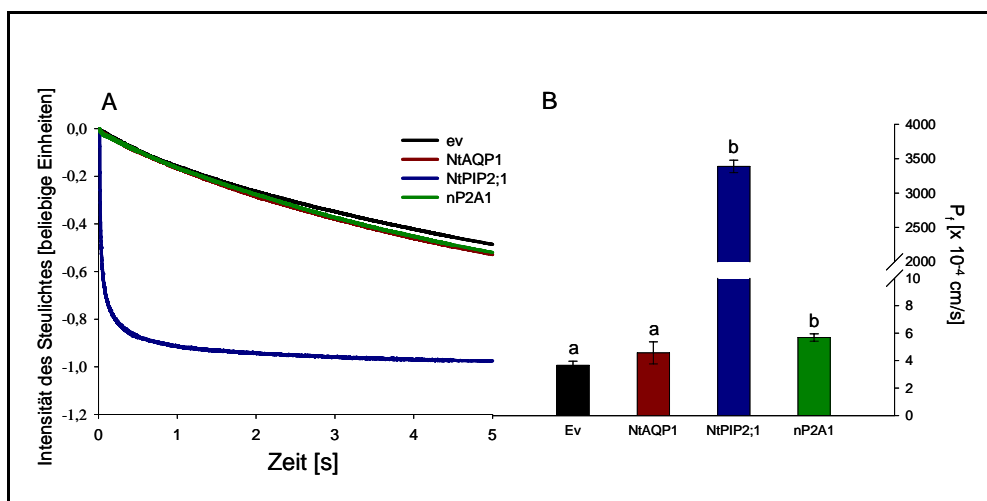


Abbildung II-7 (A) Kinetiken der Veränderung der Streulichtintensität infolge des Mischens der *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten mit einer hypoosmolaren Lösung. (B) Aus den Ratenkonstanten der Schwellkinetiken berechnete P_f-Werte der pYes2/CT- (schwarz, „Empty vector“, Ev) NtAQP1- (rot), NtPIP2;1- (blau) und nP2A1- (grün) exprimierenden *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten. Mit a und b sind die Signifikanzgruppen >0,05 bzw. <0,05 (Student Ttest) bezeichnet (n=30 ± Standard-Fehler)

Die Schwellungskinetiken wurden mit Hilfe der Software „Biokine“ mehreren exponentiellen Funktionen angeglichen. Die Ratenkonstanten der exponentiellen Funktionen wurden für die Berechnung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten P_f der Plasmamembran verwendet (Abbildung II-7B). Nach den Bestimmungen der P_f – Werte zeigte sich, dass zwischen der H₂O-Leitfähigkeit der Kontroll-Protoplasten (Ev), die mit pYes2/CT Vektor transformiert wurden, und den NtAQP1-exprimierenden Protoplasten kein signifikanter Unterschied besteht ($P_{f(Ev)}=3,65\pm0,3\times10^{-4}$ cm/s; $P_{f(NtAQP1)}=4,56\pm0,81\times10^{-4}$ cm/s; Signifikanz $>0,05$ / „Student-Ttest“). Für das chimäre nP2A1-Protein konnte hingegen eine erhöhte Wasserleitfähigkeit ($P_{f(nP2A1)}=5,68\pm0,27$ ($\times10^{-4}$) cm/s; Signifikanz $<0,05$) im Vergleich zu den Kontroll-Protoplasten festgestellt werden. Für das NtPIP2;1-Protein wurden Leitfähigkeiten berechnet, die ca. 1000-mal höher waren ($P_{f(NtPIP2;1)}=3390\pm91\times10^{-4}$ cm/s) als die der Kontroll-Protoplasten (Tabellarische Aufstellung der P_f -Werte im Anhang).

1.3 Loop B und E von NtPIP2;1

Der eigentliche Kanal eines Aquaporins wird durch Loop B und E gebildet. Bei Sequenzvergleichen der Aminosäuren von Loop B und Loop E von NtAQP1 und NtPIP2;1 zeigen sich in Loop B Unterschiede an zwei Positionen, während in Loop E fünf verschiedene Aminosäuren zu finden sind (Abbildung II-8). Um den Einfluss der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen in der Porenregion bei NtAQP1 und NtPIP2;1 auf die Wasserleitfähigkeit zu untersuchen, wurde ein chimäres Protein generiert, indem Loop B und E des NtAQP1-Proteins mit denen des NtPIP2;1 ausgetauscht wurde (Abbildung II-1; A1pP2).

A			
NtAQP1	(105)	CTAGISGGHINPAVTFGLFLARKLSLTR	
NtPIP2;1	(94)	CTAGISGGHINPAVTFGLFLARKVSLLR	
Consensus	(107)	CTAGISGGHINPAVTFGLFLARK	SL R
B			
NtAQP1	(230)	ITGTGINPARSLGAIIYNTDQAWDD	
NtPIP2;1	(219)	ITGTGINPARTFGAAVIYNTTEKIWDD	
Consensus	(232)	ITGTGINPAR	GAAIIYNT WDD

Abbildung II-8 Sequenzvergleich der Aminosäuren von Loop B (A) und Loop E (B) von NtAQP1 und NtPIP2;1

1.3.1 Generierung der A1pP2-cDNA

Die Porenregion des NtAQP1 wurde mit der des NtPIP2;1 durch mehrere hintereinandergeschaltete SOE-PCR Reaktionen ausgetauscht. Nach anschließender Aufreinigung der vollständigen chimären DNA wurde das Fragment in den Vektor pCR®2.1 kloniert. Durch gerichtete Restriktion und Ligation wurde es schließlich in den *Saccharomyces cerevisiae*-Expressionsvektor pYes2/CT transferiert. Die für die Generierung der chimären DNA notwendigen SOE-PCR Reaktionen sind in Abbildung II-9 schematisch dargestellt. Die SOE-PCR Reaktionen wurden durch Sequenzierung der kompletten A1pP2-cDNA in dem Vektor pCR®2.1 überprüft.

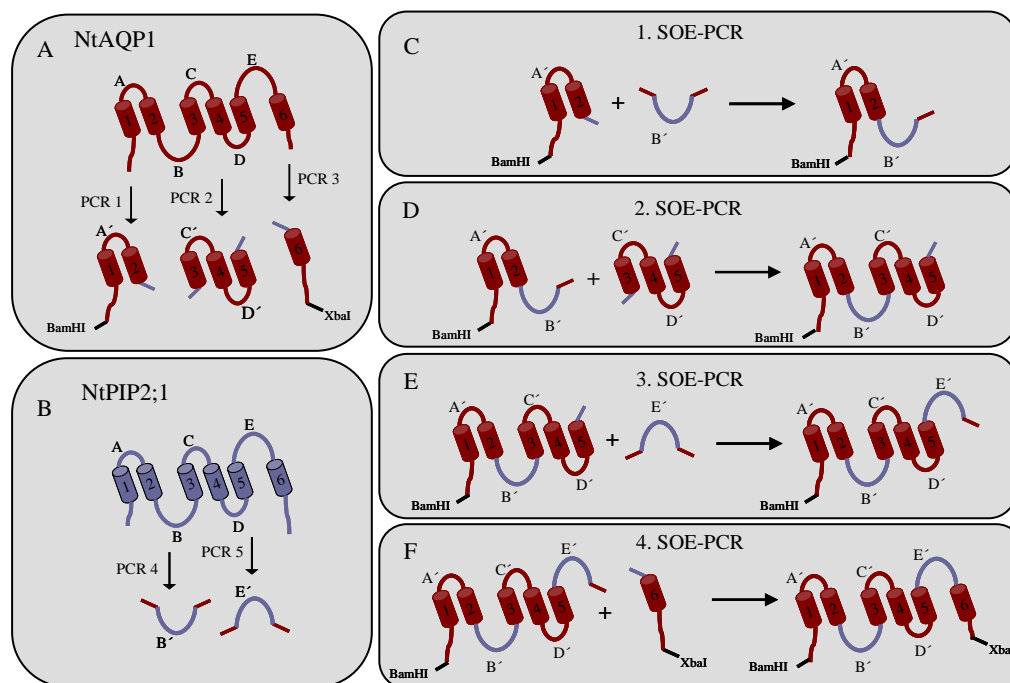


Abbildung II-9 Schematische Darstellung der Generierung der A1pP2-cDNA. Während der initialen PCR-Reaktionen wurden die zu fusionierenden DNA-Fragmente von NtAQP1 und NtPIP2;1 mit überlappenden Primern amplifiziert (A und B). In den Folgenden SOE-PCR Reaktionen wurde das chimäre Protein schrittweise zusammengefügt (C-F).

1.3.2 „Western-Blot“-Analysen des A1pP2-Proteins

Zum Nachweis des A1pP2-Proteins wurde eine Präparation von Membranproteinen aus A1pP2-exprimierender *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen angefertigt. Nach Auftrennung des Proteingemisches durch SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine mit einem NtAQP1-spezifischen Antikörper hybridisiert (Abbildung II-5). Es konnte kein Signal in der Größenordnung

des A1pP2-Proteins (ca. 28kDa) in der Membranprotein-Präparation detektiert werden. Somit wurden die *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen nicht für nachfolgende Leitfähigkeitsmessungen herangezogen.

1.4 Die C-terminale Hälfte von NtPIP2;1

Durch den Austausch der kompletten „2. Hälfte“ (Helix 4, 5 und 6) des NtAQP1-Proteins durch die des NtPIP2;1 wurde deren Einfluss in einem chimären Protein untersucht (Abbildung II-1; cA1P2). Im C-Terminus der PIP2 Aquaporine befinden sich potentielle regulatorische Elemente, die möglicherweise die Leitfähigkeit des Proteins beeinflussen. Mit der Aminosäure Serin im C-Terminus von SoPIP2;1 konnte eine mögliche Phosphorylierungsstelle identifiziert werden (Johansson *et al.*, 1998). Während in NtPIP2;1 eine zu SoPIP2;1 homologe Serin-Aminosäure zu finden ist, fehlt sie am C-Terminus von NtAQP1.

1.4.1 Generierung der cA1P2-cDNA

In zwei initialen PCR-Reaktionen wurden die DNA-Sequenzen der Aminosäuren 1 bis 166 von NtAQP1, bzw. 154 bis 284 von NtPIP2;1 mit homologen Bereichen am 3'- bzw. 5'-Ende amplifiziert (Abbildung II-10). In der folgenden SOE-PCR-Reaktion erfolgte die Fusion der beiden DNA-Fragmente. Mittels T/A-Klonierung in den Vektor pCR®2.1 und Sequenzierung des PCR-Produktes wurde die SOE-Reaktion überprüft. Durch eine anschließende Restriktion und Ligation der cA1P2-cDNA und des Vektors pYes2/CT wurde der Expressionsvektor angefertigt. Die erfolgreiche Transformation der Plasmid-DNA in den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm SY1 konnte durch eine Plasmid-Präparation mit nachfolgender Restriktion bestätigt werden.

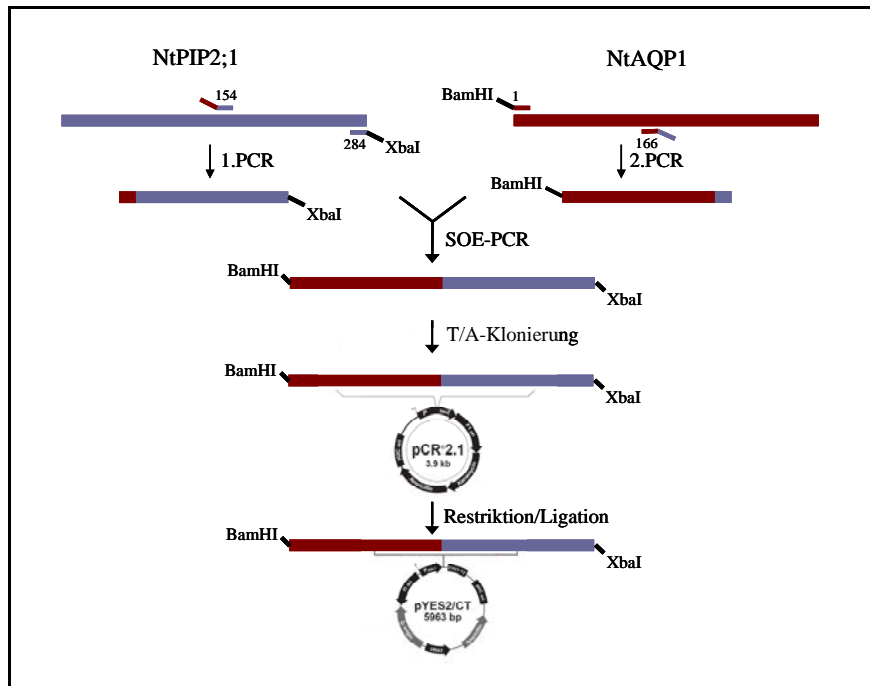


Abbildung II-10 Klonierungsstrategie des cA1P2-Proteins. In einer ersten PCR-Reaktion wurden die Helices 1, 2 und 3 von NtAQP1 bzw. 4, 5 und 6 von NtPIP2;1 mit homologen Bereichen in den Verbindungssequenzen amplifiziert. Während der folgenden SOE-PCR-Reaktion wurden die DNA-Fragmente fusioniert. Durch T/A-Klonierung mit anschließender Sequenzierung wurde die Sequenz der cA1P2-cDNA überprüft. Durch Restriktion und Ligations-Reaktionen wurde das cA1P2-Fragment im Folgenden in den Hefeexpressionsvektor pYES2/CT kloniert.

1.4.2 „Western-Blot“-Analysen des cA1P2-Proteins

Zur Überprüfung der Expression des cA1P2-Fusionsproteins wurde eine Membranprotein-Präparation aus den cA1P2-exprimierenden Hefezellen angefertigt. Durch die Hybridisierung mit einem für NtAQP1-spezifischen Antikörpers während einer „Western-Blot“-Prozedur sollte das cA1P2-Protein detektiert werden. Es konnte jedoch kein Protein in der Größenordnung des cA1P2-Proteins in der Protein-Präparation nachgewiesen werden (Abbildung II-5).

Durch die Schwierigkeit der Expression von chimären Proteinen aus NtAQP1 und NtPIP2;1 in den Membranen von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen wurde die Untersuchung der strukturellen Voraussetzungen für den Wassertransport mit Hilfe dieser Technik nicht weiter verfolgt.

Im Folgenden werden stattdessen verschiedene Regulationsmechanismen der Aquaporin-Aktivität betrachtet und ihr Einfluss auf die H₂O-Leitfähigkeit von NtAQP1 und NtPIP2;1 untersucht. In kürzlich erschienenen Veröffentlichungen wurde gezeigt,

dass die Interaktion von PIP1 und PIP2 Aquaporinen innerhalb eines Tetramers die H₂O-Leitfähigkeit der Plasmamembran modifizieren kann (Fetter *et al.*, 2004). Durch die Konstruktion von künstlichen Heterotetrameren mit verschiedenen Verhältnissen von NtAQP1 und NtPIP2;1 wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Heteromerisierung auf die Funktion der Aquaporine untersucht.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob ein vor kurzer Zeit postulierter „Gating“-Mechanismus (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006) die Wasserleitfähigkeit von NtPIP2;1 und NtAQP1 reguliert. Durch Mutation der Schlüssel-Aminosäuren und den Einsatz von Phosphatase- und Kinase-Inhibitoren wurde die Relevanz des „Gating“-Mechanismus auf die Funktion von NtPIP2;1 und NtAQP1 untersucht.

2 Regulation der PIP–Aktivität: Heteromerisierung

2.1 Heteromerisierung von NtAQP1 und NtPIP2;1

Die Plasmamembran stellt einen wichtigen Ort der Regulation des Metabolismus und der Kommunikation zwischen Pflanzenzellen dar. Durch integrale Transportmoleküle und Kanäle werden Metabolite oder die initialen Signale von komplexen Kaskaden weitergegeben. Die Oligomerisierung von Membranproteinen stellt einen bedeutsamen Regulationsmechanismus dar, mit deren Hilfe die Zelle schnell auf Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren kann (Veenhoff *et al.*, 2002). Dass die Interaktion von verschiedenen Aquaporin-Isoformen Auswirkungen auf die H₂O-Leitfähigkeit der Plasmamembran hat, wurde durch die Coexpression von PIP1- und PIP2-Aquaporinen aus Mais in *Xenopus laevis*-Oozyten gezeigt (Fetter *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur Expression einzelner Aquaporin Isoformen konnte eine Erhöhung der Leitfähigkeit der Plasmamembran für H₂O festgestellt werden. In der vorgelegten Arbeit wurde der Einfluss von unterschiedlichen Verhältnissen von NtAQP1- und NtPIP2;1-Proteinen in Heterotetrameren auf die Leitfähigkeit im Vergleich zu einem künstlichen NtPIP2;1-Homotetramer untersucht.

2.2 Herstellung von künstlichen Homo- und Heterotetrameren

Die Monomere der künstlichen Homo- bzw. Heterotetramere wurden durch Anfügen von Erkennungs-Sequenzen für Endonukleasen am N- und C-Terminus miteinander verknüpft. Mit modifizierten Primern konnten während einer PCR die Restriktionsschnittstellen an die Termini der Proteine angefügt werden. Anschließend erfolgte die T/A-Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pCR®2.1 bzw. pDrive. Im Folgenden wurden die einzelnen Monomere durch Restriktion und Ligation im Vektor pCR®2.1 N- und C-terminal verknüpft. Anschließend konnten die künstlichen Tetramere in den Hefeexpressionsvektor pYes2.1 kloniert werden (Abbildung II-11). Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm SY1 wurde mit den Konstrukten transformiert, und, nach erfolgreicher Selektion transformierter Hefezellen, der osmotische Permeabilitätskoeffizient P_f der Hefe-Protoplasten bestimmt.

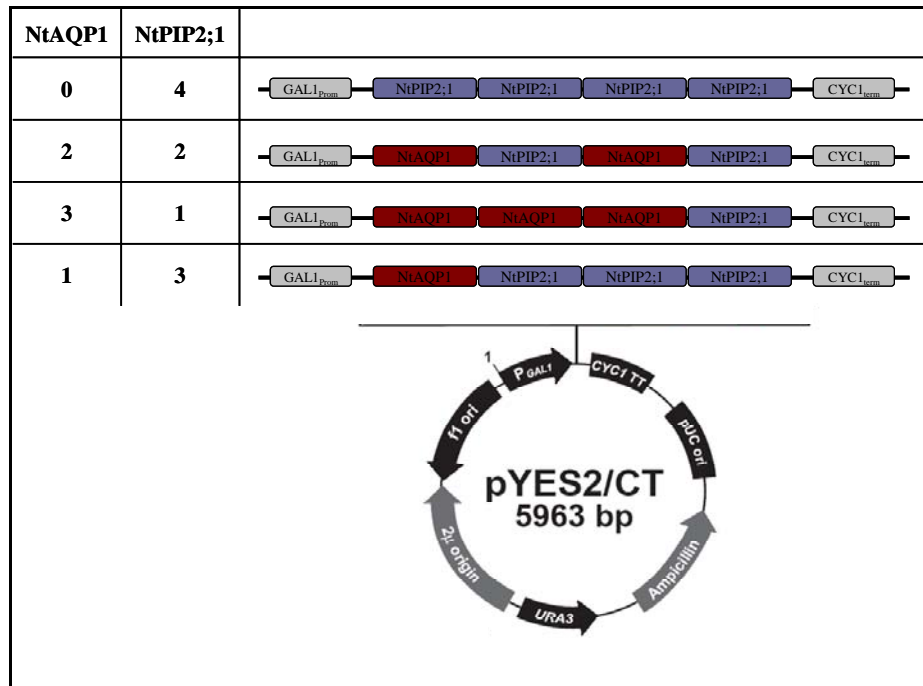


Abbildung II-11 Aufbau der künstlichen Tetramere mit verschiedenen Verhältnissen an NtAQP1 und NtPIP2;1 in dem Hefe-Expressionsvektor pYes2/CT (Invitrogen®).

2.3 „Western-Blot“-Analysen der künstlichen Tetramere

Zum Nachweis der Tetramere in den Membranen, wurde von SY1-Zellen, die ein künstliches Tetramer exprimierten eine Membranprotein-Präparation angefertigt. Die Proteine wurden im Anschluss an eine „Western-Blot“-Prozedur durch Hybridisierung mit einem NtPIP2;1-spezifischen Antikörper nachgewiesen (Abbildung II-12). Die Expression des künstlichen NtPIP2;1-Homotetramers und der Heterotetramere mit NtAQP1- und NtPIP2;1-Proteinen im Verhältnis 2:2 und 3:1 konnten erfolgreich in den Membranen der SY1-Zellen detektiert werden.

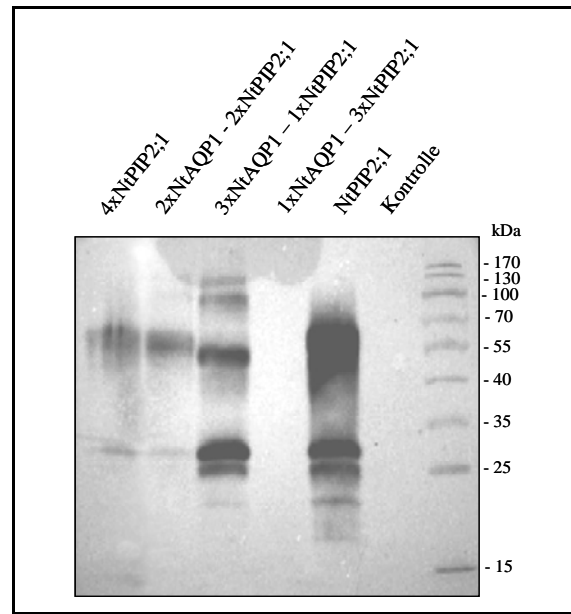


Abbildung II-12 „Western-Blot“ mit Membranprotein-Präparationen aus *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen die die künstlichen Aquaporin-Tetramere exprimierten. Durch die Hybridisierung mit einem NtPIP2;1-spezifischen Antikörper wurden die Tetramere auf der Nitrozellulose-Membran detektiert. Als Positiv-Kontrolle diente eine Präparation der Membranproteine aus NtPIP2;1-exprimierender Hefe. Die Kontroll-Zellen wurden mit leerem pYes2/CT Vektor (Kontrolle) transformiert

2.4 Zeitlicher Verlauf der Tetramer-Expression

Der Zeitpunkt der maximalen H₂O-Leitfähigkeit nach Induktion der Expression der künstlichen Tetramere wurde durch die funktionelle Analyse der Hefezellen 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 16h und 24h nach der Zugabe von Galaktose untersucht (Abbildung II-13). Nach der Bestimmung der Ratenkonstanten der Schwell-Kinetiken zeigte sich, dass 16h nach der Induktion die Leitfähigkeit der Plasmamembran für H₂O maximal war. Die folgenden funktionellen Untersuchungen wurden demzufolge nach einer 16stündigen Expression der Tetramere durchgeführt.

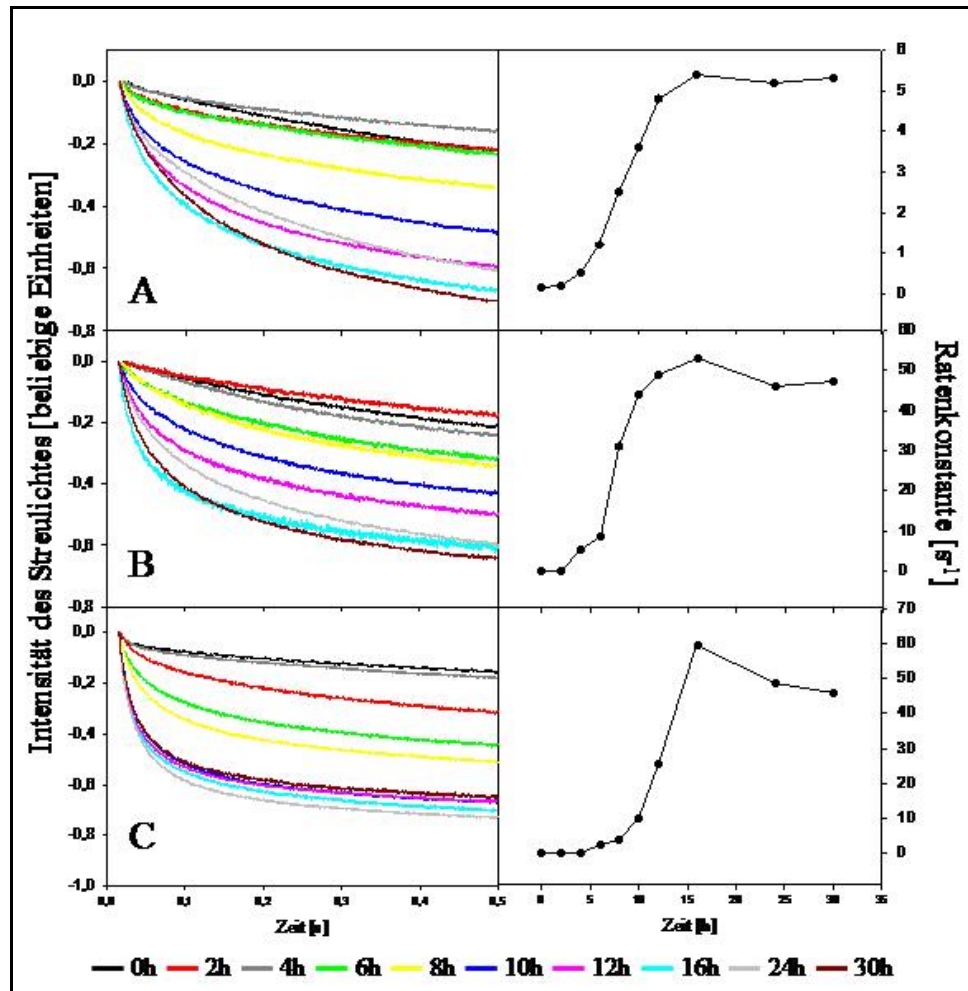


Abbildung II-13 Verlauf der Schwell-Kinetiken nach Induktion der Expression der künstlichen Tetramere in *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten. In A sind die Kinetiken für das künstliche Heterotetramer aus 3xNtAQP1 und 1xNtPIP2;1 mit den zugehörigen Ratenkonstanten der angeglichenen Exponentialfunktionen, dargestellt. B zeigt die Kinetiken und Ratenkonstanten für das künstliche Tetramer aus 2xNtAQP1 und 2xNtPIP2;1 und C für das Homotetramer aus 4xNtPIP2;1.

2.5 Bestimmung des P_T -Wertes der künstlichen Heterotetramere

Durch die Aufnahme des Schwellens von transformierten Hefeprotoplasten im „Stopped-Flow“-Spektrometer und Angleichung der Kinetiken an mehrere exponentielle Funktionen mit Hilfe der Software „Biokine“ wurden die Ratenkonstanten der H_2O -Aufnahme ermittelt. Mit den Ratenkonstanten konnten im Anschluss die P_T -Werte berechnet werden (Abbildung II-14).

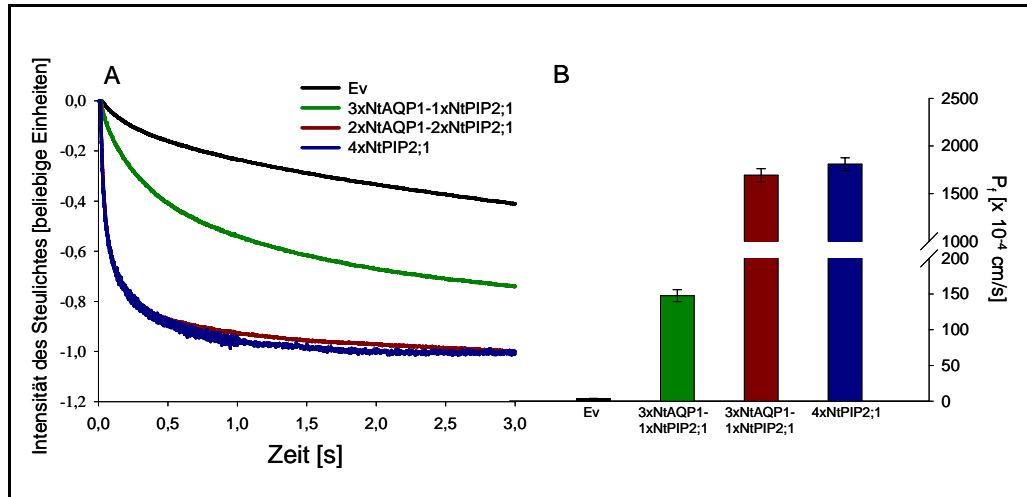


Abbildung II-14 (A) graphische Darstellung der H_2O -Aufnahmeraten der *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten die die künstlichen Tetramere exprimierten. (B) Nach der Bestimmung der Ratenkonstanten der Schwell-Kinetiken der Protoplasten konnten die osmotische Permeabilitätskoeffizient (P_f) der Plasmamembran berechnet werden. ($n=30 \pm \text{Standard-Fehler}$)

Die Messungen zeigten, dass die Plasmamembranen der Hefezellen, die das artifizielle NtPIP2;1-Homotetramer exprimierten, eine ca. 500-mal höhere Leitfähigkeit für Wasser vorwiesen als die Hefezellen mit dem leeren pYes2/CT Plasmid (Ev, „Empty vector“). Die Hefezellen mit dem künstlichen Heterotetramer mit einem NtAQP1/NtPIP2;1-Verhältnis von 2:2 zeigten eine um 10% verminderte Leitfähigkeit als das Homotetramer. Nach der Expression des Heterotetramers einem Verhältnis von 3:1 (NtAQP1/NtPIP2;1) reduzierte sich die Leitfähigkeit der Plasmamembran deutlich um ca. 92% im Vergleich zum P_f -Wert für das NtPIP2;1-Homotetramer (Tabellarische Aufstellung der P_f -Werte im Anhang).

3 Regulation der Aquaporin-Aktivität: Aquaporin-„Gating“

Im Allgemeinen bezeichnet man Kanalproteine in Membranen als „gated“, wenn aufgrund eines äußeren Reizes eine Konformationsänderung vermittelt wird und die Leitbahn für Substratmoleküle durch eine strukturelle Domäne des Proteins blockiert wird. Innerhalb dieses Mechanismus öffnet oder verschließt die strukturelle Domäne wie ein Tor (engl. „gate“) den Kanal. Bei spannungsabhängigen Kaliumkanälen wurde z.B. eine Sequenz von positiv geladenen Aminosäuren am Eingang der Porenregion identifiziert, deren Verschiebung als Reaktion auf Änderungen im Membranpotential eine Konformationsänderung des Proteins vermittelt, in deren Folge die Porenregion geöffnet oder verschlossen wird (Hille, 1992; Bezanilla, 2005).

Im Falle der Aquaporine wurde ein „Gating“-Mechanismus durch die Modellierung des PIP₂:1-Tetramers aus Spinat (SoPIP₂:1) und Struktur-Funktions-Analysen von PIP-Aquaporinen aus *Arabidopsis thaliana* im *Xenopus laevis*-Oozyten-System postuliert (Abbildung II-15) (Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Kukulski *et al.*, 2005; Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). Hierbei konnte einem hoch konservierten Histidin (His193 in SoPIP₂:1) im Loop D eine Schlüsselrolle bei der Wahrnehmung des zytosolischen pH-Wertes und des möglichen „Tormechanismus“ zugewiesen werden.

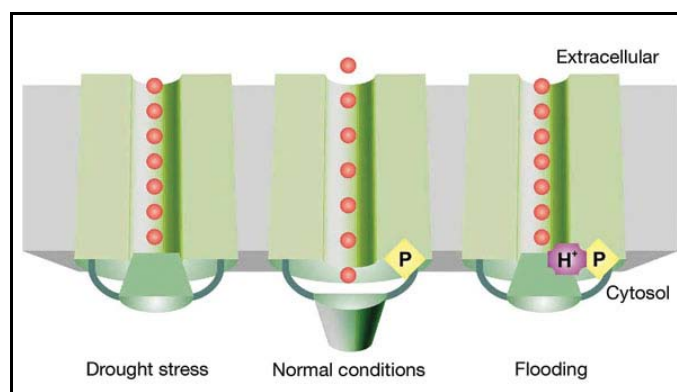


Abbildung II-15 Schematische Darstellung des „Gating“-Mechanismus für Plasmamembran intrinsische Proteine. Als Reaktion auf Trockenstress (Drought stress) schließt demnach der Kanal durch die Dephosphorylierung von zwei hoch konservierten Serin-Aminosäuren. Bei Überflutung (Flooding) wird der Verschluss durch die Protonierung einer konservierten Histidin-Aminosäure vermittelt (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006)

Im geschlossenen Zustand wird Loop D des SoPIP₂:1-Monomers durch Bildung von Wasserstoff-Brücken und ionischen Wechselwirkungen mit Aminosäuren des N-

Terminus über dem Ausgang der Porenregion positioniert. Durch die Phosphorylierung einer Serin-Aminosäure im Loop B (Ser115) und am C-Terminus (Ser274) werden die Interaktionen zwischen den Aminosäuren aufgehoben und Loop D verlagert sich. Infolge dieser Konformationsänderung kann der Wasserfluss durch die Pore stattfinden. Sauerstoffmangel, der z.B. durch Überflutung der Wurzeln hervorgerufen werden kann, führt in den Zellen zu einer Erniedrigung des zytosolischen pH-Wertes. Es kommt zu einer Protonierung des His193 im Loop D und einer Wechselwirkung mit einer negativ geladenen Aspartat Aminosäure im N-Terminus von SoPIP2;1. Wegen der starken Interaktion wird Loop D trotz phosphorylierter Ser115 und Ser274 vor der Porenregion gehalten und unterbindet den Wasserfluss durch den Kanal. Die Schlüssel-Aminosäuren (His193, Ser118, Ser277) sind hoch konserviert, daher wurde der „Gating“-Mechanismus als allgemein gültig für alle pflanzlichen PIP beschrieben.

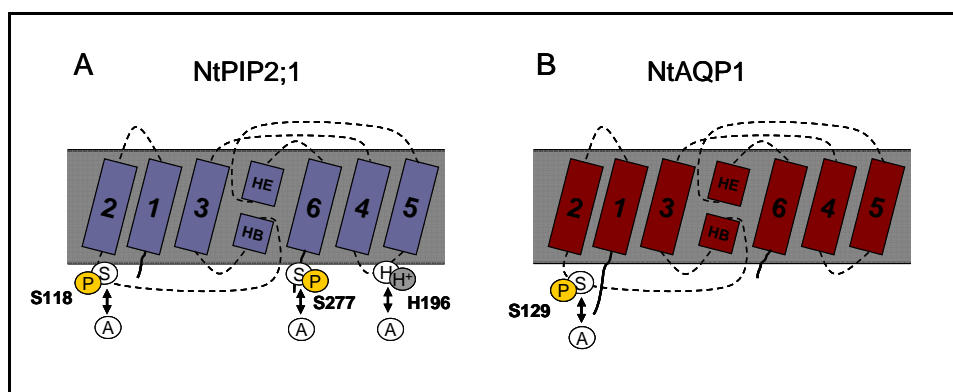


Abbildung II-16 Schematische Darstellung von NtPIP2;1 (A) und NtAQP1 (B). Eingezeichnet sind die zu Alanin mutierten Serin- und Histidin-Aminosäuren.

Im Folgenden wurde untersucht, ob das postulierte „Gating“-Model für NtAQP1- und NtPIP2;1 einen regulatorischen Mechanismus darstellt. Hierzu wurden Mutanten der beiden Proteine generiert, in denen die homologen Schlüssel-Aminosäuren zu SoPIP2;1 in NtAQP1 und NtPIP2;1 mit Alanin ausgetauscht wurden (Abbildung II-16). Weiterhin wurde eine NtPIP2;1-Mutante (NtPIP2;1_S118A/S288A) mit veränderten Ser118 und Ser277 hergestellt. Außerdem konnte eine weitere NtPIP2;1-Mutante (NtPIP2;1_H196A/S277A) erzeugt werden, die ein mutiertes Ser277 und His196 trägt. Durch die Modifizierung der Aminosäuren sollte zum Einen die Protonierung des konservierten Histidins zur Wahrnehmung des sinkenden zytosolischen pH und zum Anderen die Phosphorylierung der Proteine unterbunden werden. Mutanten und nicht modifizierte Proteine wurden in *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen exprimiert und

funktionell durch das Schwellen von Protoplasten und „Stopped-Flow“-Spektrometrie untersucht.

3.1 Expression der NtAQP1- und NtPIP2;1-Mutanten

Die Expression der unmodifizierten Aquaporine und der Mutanten wurden durch „Western-Blot“-Analysen von Membranproteinfraktionen der *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen untersucht (Abbildung II-17). Durch die Hybridisierung mit aquaporinspezifischen Antikörpern konnten die Proteine in den Präparationen nachgewiesen werden. Zudem zeigte der Vergleich der Intensitäten der Chemilumineszenz-Signale eine nahezu identische Proteinkonzentration der Proteine zu dem Zeitpunkt der Leitfähigkeitsmessungen in den Membranen an.

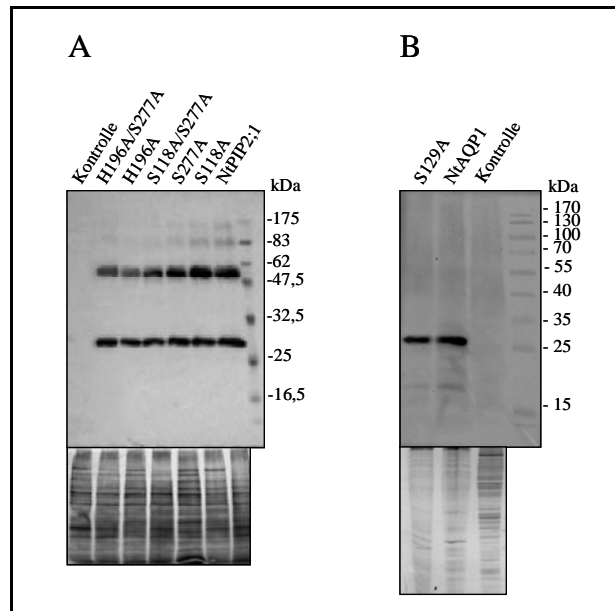


Abbildung II-17 „Western-Blot“-Verfahren mit Membranprotein-Präparationen aus *Saccharomyces cerevisiae*. In A sind die Signale der Mutanten von NtPIP2;1 dargestellt. Gleiche Proteinkonzentrationen wurden durch die koloidale Silberfärbung der Nitrozellulosemembran nachgewiesen. (kleines Bild unterhalb) Als Kontrollen wurden Membranproteine aus Hefezellen angefertigt die das unmodifizierte NtPIP2;1 exprimierten oder mit leerem pYES2/CT Vektor (Kontrolle) transformiert wurden. In B wurde eine Membranprotein-Präparation von Hefezellen die das NtAQP1-Protein mit der Mutation an Position 129 exprimierten, mit einem NtAQP1-spezifischen Antikörper hybridisiert. Als Kontrolle dienten auch hier das native Aquaporin (NtAQP1) und die leere Vektor-Kontrolle (Kontrolle). Gleiche Proteinmengen in den Präparationen wurden durch die Coomassie-Färbung der SDS-PAGE (kleines Bild unterhalb) nachgewiesen.

3.2 Bestimmung des zytosolischen pH-Wertes von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten

Die Überprüfung des „Gating“-Mechanismus verlangte eine Messung der H₂O-Aufnahmerate der Protoplasten bei steigender Protonen-Konzentration innerhalb der Hefezellen. Die Reduktion des zytosolischen pH-Werte der Protoplasten wurde sowohl durch die Veränderung des pH-Wertes der Mess-Puffer von pH7,5 auf pH5 als auch durch die Inkubation mit 50mM Natrium-Essigsäure bei einem pH5 des Puffers erreicht.

Tabelle 1 Zytosolische pH-Werte von Saccharomyces cerevisiae bei extrazellulären pH-Werten von 7,5, 5 und nach Gabe von 50mM Natriumacetat bei pH5 (n=3)

pH _{out}	7,5	5	5 + 50mM NaAc
pH _{in}	6.46 ± 0.03	6.34 ± 0.03	6.13 ± 0.03

Der pH-Wert im Zytosol der *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen wurde durch den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein bestimmt. Zu Beginn der Messung erfolgte eine Kalibrierung der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz. Mit Hilfe der Gleichung der angeglichenen exponentiellen Funktion konnten im weiteren Verlauf die intrazellulären pH-Werte berechnet werden (Abbildung II-18). Im Anschluss an die Inkubation mit Fluorescein-Bisacetat wurden die Hefe-Protoplasten in SF-Puffer mit pH7,5 bzw. pH5 aufgenommen. Die Fluoreszenz-Intensität des intrazellulären Fluoresceins wurde im Spektrofluorimeter bestimmt und der pH-Wert durch Einsetzen in die Eichgerade berechnet. Hierbei konnte ein zytosolischer pH-Wert der Hefezellen von 6,46±0,03 bei pH7,5 bzw. 6,34±0,03 bei pH5 bestimmt werden (Tabelle 1).

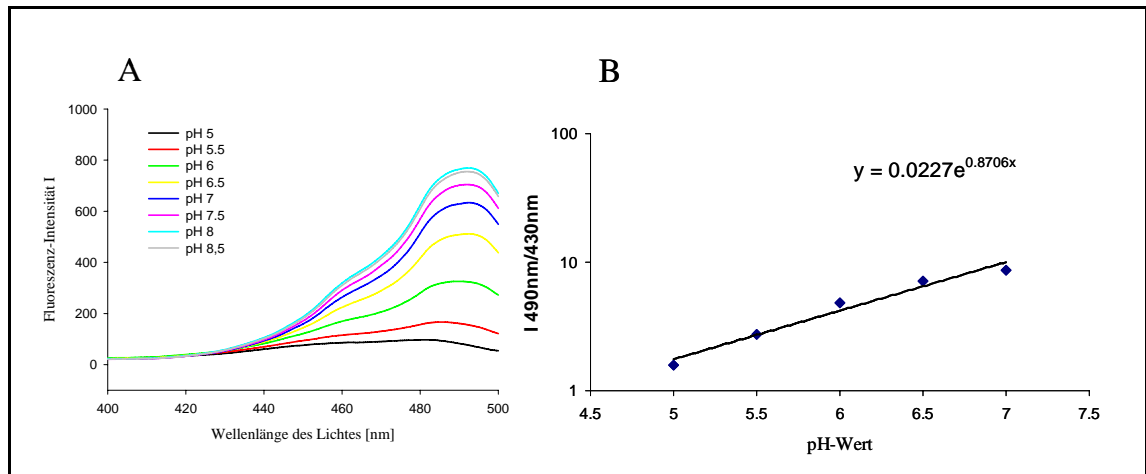


Abbildung II-18 Kalibrierung der pH-abhängigen Fluoreszenz von Fluorescein. (A) Spektren von 1 µM Fluorescein in McIlvains-Puffer bei verschiedenen pH-Werten. (B) Logarithmische Auftragung der Quotienten der Fluoreszenz-Intensitäten bei 490 und 430 nm gegen den pH-Wert. Durch die Angleichung einer exponentiellen Funktion an den Verlauf der Quotienten konnte der zytosolische pH-Wert bestimmt werden.

Durch die Inkubation mit 50 mM Natrium-Essigsäure bei pH 5 konnte nach 5 min eine weitere Reduktion des intrazellulären pH um 0,2 Einheiten auf $6,13 \pm 0,03$ beobachtet werden (Abbildung II-19, Tabelle 1).

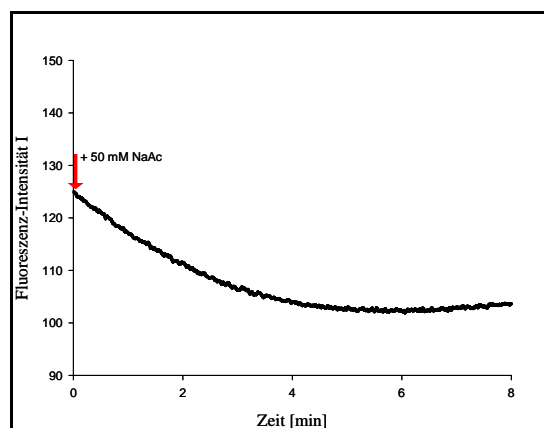


Abbildung II-19 Verlauf der Fluoreszenz-Intensität nach Zugabe von 50 mM Natrium-Essigsäure zu Fluorescein-beladenen *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten.

3.3 Bestimmung der P_r -Werte für NtPIP2;1 und NtPIP2;1-Mutanten exprimierende *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten

Bei den Messungen der Wasseraufnahmerate der *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten bedingte die Reduktion des zytosolischen pH-Wertes keine Änderungen der H_2O -Leitfähigkeit der Plasmamembran der Kontroll-Protoplasten (Ev). Bei NtPIP2;1-exprimierenden Protoplasten führte die erhöhte intrazelluläre Protonen-

Konzentration dagegen zu einer Minderung des P_f von $3390 \pm 56 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ (pH_i 6,46) um 36 bzw. 47% auf $2500 \pm 85 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ (pH_i 6,34) und $1590 \pm 52 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ (pH_i 6,13) (Abbildung II-21). Ein P_f -Wert von $1700 \pm 22 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ bei pH_i 6,46 konnte für *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten bestimmt werden, die das NtPIP2;1 mit dem Aminosäureaustausch am His196 zu Alanin exprimierten. Die Reduktion des intrazellulären pH-Wertes zog jedoch keine weitere Verringerung des P_f -Wertes nach sich (Abbildung II-21, tabellarische Aufstellung der P_f -Werte im Anhang).

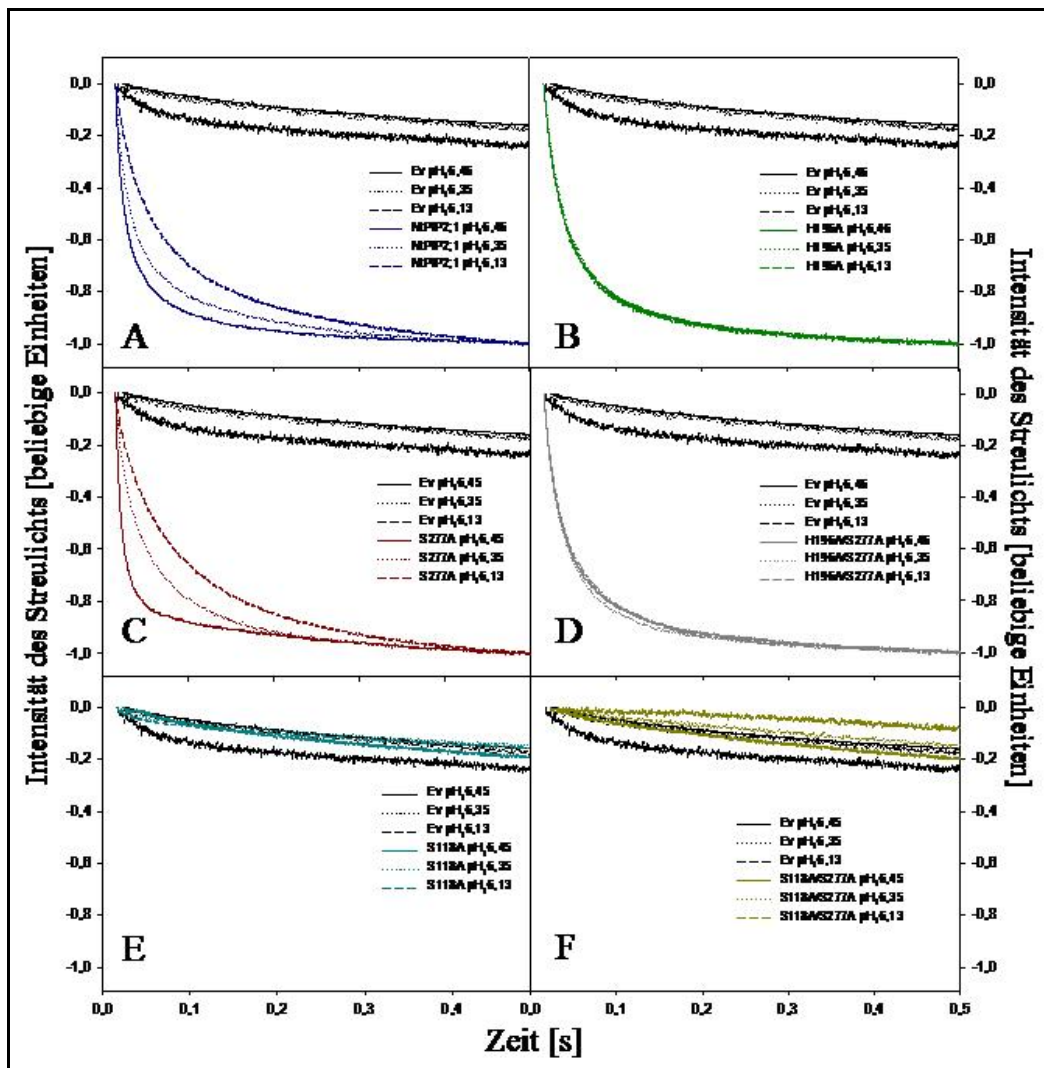


Abbildung II-20 Verlauf der H_2O -Aufnahme von NtPIP2;1 (A), NtPIP2;1_H196A (B), NtPIP2;1_S277A (C), NtPIP2;1_H196A/S277A (D), NtPIP2;1_S118A (E) und NtPIP2;1_S118A/S277A (F) exprimierenden *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten bei verschiedenen intrazellulären pH-Werten im Vergleich zu Kontroll-Protoplasten (Ev), die mit dem pYesDest52-Vektor transformiert wurden. Die Kurven stellen einen Durchschnitt von jeweils 10 Schwellungskinetiken einer Protoplastenpräparation dar.

Neben der Protonierung des Histidins stellt die Phosphorylierung der Serin-Aminosäuren an Position 115 und 274 in SoPIP2;1 einen bedeutenden Mechanismus des „Gating“-Modells dar. Die Mutation des zu Ser274 in SoPIP2;1 homologen Ser277 in NtPIP2;1 führte zu einer fast 50%igen Steigerung des P_f -Wertes bei pH_i 6,46 im Vergleich zu NtPIP2;1-exprimierenden Protoplasten (Abbildung II-21). Die Herabsetzung des zytosolischen pH-Wertes auf 6,34 bzw. 6,13 bewirkte hier eine Reduktion des P_f der Protoplasten auf $2800 \pm 273 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ bzw. $1630 \pm 138 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$.

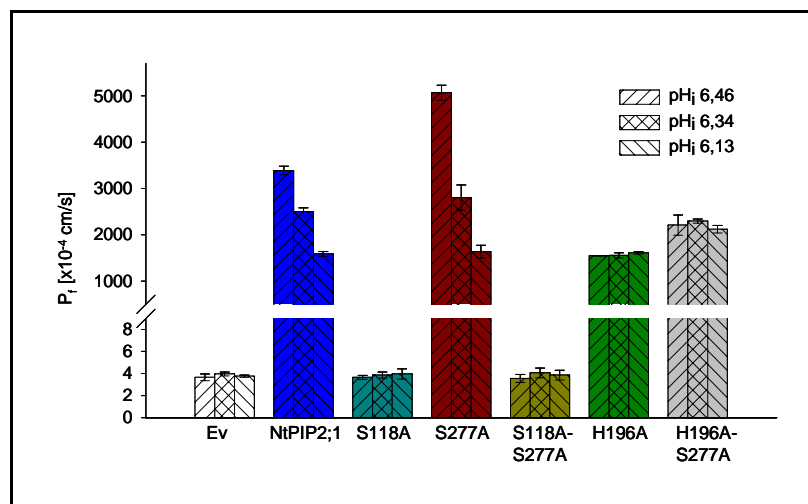


Abbildung II-21 P_f -Werte von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten die das native NtPIP2;1, NtPIP2;1_S118A, NtPIP2;1_S277A, NtPIP2;1_S118A/S277A, NtPIP2;1_H196A und NtPIP2;1_H196A/S277A exprimierten. Die Messungen wurden bei zytosolischen pH-Werten von 6,46, 6,34 und 6,13 durchgeführt ($n=30 \pm$ Standard-Fehler)

Im Gegensatz zu NtPIP2;1_S277A verursachte der Austausch von Ser118 in NtPIP2;1 mit der Aminosäure Alanin eine Verringerung der H_2O -Aufnahmerate ($P_f=3,29 \pm 0,37 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$) auf das Niveau der Kontroll-Protoplasten. Hier hatte die Herabsetzung des zytosolischen pH-Wertes keinen weiteren Einfluss auf die Leitfähigkeit der Plasmamembran (Abbildung II-21). Nahezu identische P_f -Werte konnten für die NtPIP2;1-Mutante mit veränderten Serin-Aminosäuren an Position 118 und 277 ermittelt werden (Abbildung II-21). Die *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten die das NtPIP2;1 mit verändertem Ser277 und His196 exprimierten, wiesen einen P_f -Wert von $2380 \pm 56 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$. Eine pH-abhängige Reduktion des P_f -Wertes konnte auch hierbei nicht beobachtet werden (Abbildung II-21).

3.4 Behandlung der NtPIP2;1-exprimierenden Hefezellen mit Phosphatase- und Kinase-Inhibitoren

Um den Einfluss der Phosphorylierung auf die Funktion von NtPIP2;1-exprimierenden Protoplasten weiter zu untersuchen, wurden die Zellen vor den Messungen der H₂O-Leitfähigkeit mit dem Kinase-Inhibitor K252a oder dem Phosphatase-Inhibitor Okadasäure inkubiert. Dem „Gating“-Model entsprechend sollte nach der Inkubation mit dem Kinase-Inhibitor eine verringerte Wasserpermeabilität der Plasmamembran der NtPIP2;1-exprimierenden Protoplasten zu beobachten sein. Unter diesen Bedingungen wären eine Phosphorylierung und die damit verbundene Öffnung des Kanals nicht mehr gewährleistet. Im Gegensatz dazu sollte die Inkubation mit dem Phosphatase-Inhibitor, aufgrund der Hemmung der Dephosphorylierung des Aquaporins, eine Steigerung der H₂O Leitfähigkeit nach sich ziehen.

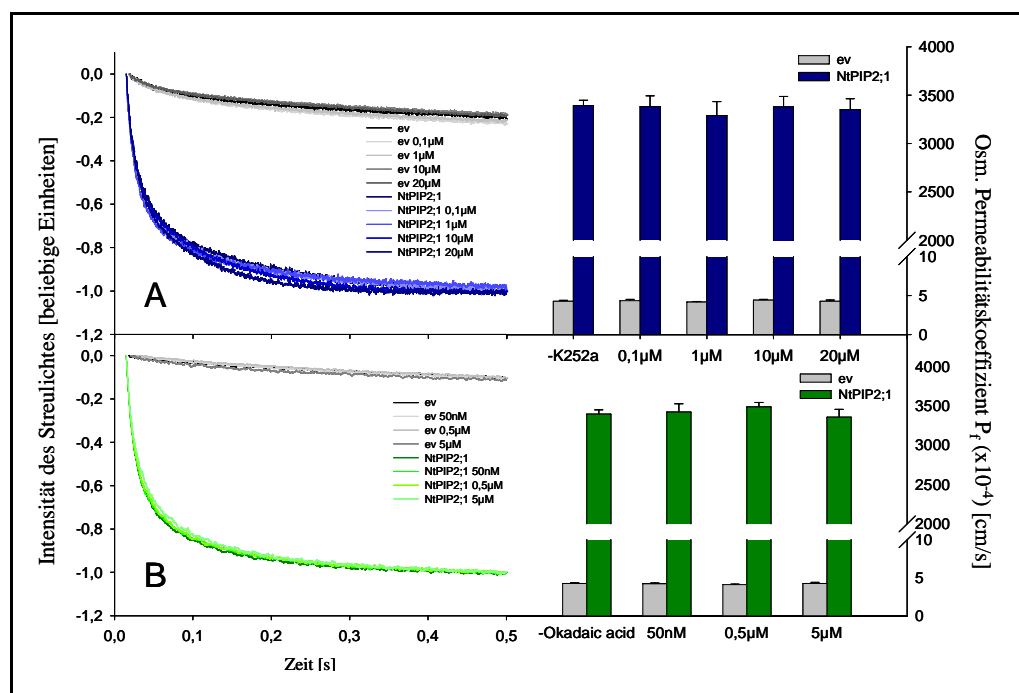


Abbildung II-22 Inkubation von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten mit verschiedenen Konzentration von (A) Kinase-Inhibitor K252a und (B) Phosphatase-Inhibitor Okadasäure. Die angegebenen P_f -Werte geben Durchschnittswerte von 30 Schwellenexperimenten an (\pm Standard-Fehler)

Tatsächlich war nach der Inkubation der NtPIP2;1-exprimierenden Protoplasten mit steigenden Konzentrationen des Phosphatase- bzw. Kinase-Inhibitors keine Veränderungen in der Leitfähigkeit zu beobachten (Abbildung II-22). Die Wirkung der Inhibitoren wurden anschließend durch die Hybridisierung einer Proteinpräparation aus

K252a- bzw. Okadasäure-behandelten Protoplasten mit einem Phosphoprotein-spezifischen Antikörper während einer „Western-Blot“-Prozedur nachgewiesen (Abbildung II-23). Bei gleichen Mengen an untersuchten Proteinen konnte in der Präparation der K252a-behandelten Protoplasten eine geringere Konzentration phosphorylierter Proteine als in unbehandelten Protoplasten detektiert werden. Die Behandlung der Protoplasten mit Okadasäure bedingte indessen eine gesteigerte Menge an Phosphoproteinen in den Präparationen (Abbildung II-23).

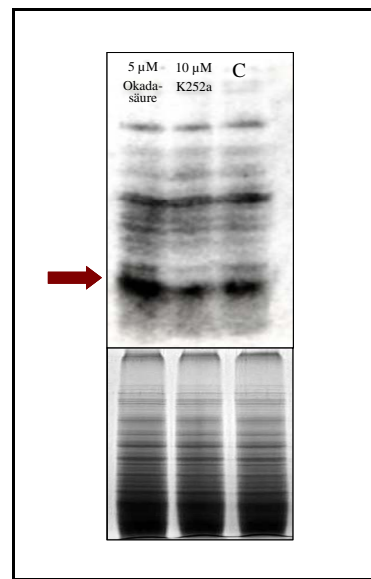


Abbildung II-23 Nachweis phosphorylierter Proteine in Protein-Präparationen von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten inkubiert mit 5µM Phosphatase-Inhibitor Okadasäure oder 10µM Kinase-Inhibitor K252a. Die Protein-Präparationen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit dem Phosphoprotein-spezifischen Antikörper 1C8 (Calbiochem) hybridisiert. Der rote Pfeil markiert den Bereich der Proteine mit den deutlichsten Unterschieden in dem Grad der Phosphorylierung nach der Behandlung mit den Inhibitoren im Vergleich zu der unbehandelten Präparation. Die Auftrennung gleicher Proteinmengen wurde in einer SDS-PAGE and anschließender Coomassie-Färbung nachgewiesen (kleiBild unterhalb)

3.5 „Gating“ von NtAQP1

Aufgrund der postulierten Allgemeingültigkeit des „Gating“-Mechanismus für pflanzliche PIP wurde auch die zu Ser115 in SoPIP2;1 homologe Serin-Aminosäure an Position 129 in NtAQP1 mit Alanin ausgetauscht. Am C-Terminus von NtAQP1 ist keine zu Ser277 homologe Serin-Aminosäure zu finden.

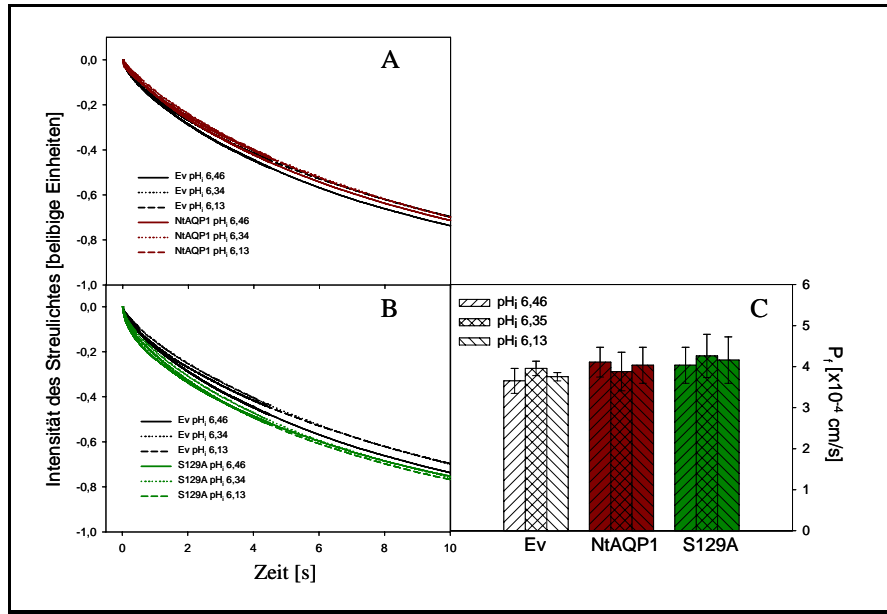


Abbildung II-24 Zeitlicher Verlauf des Schwellens von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten die das native NtAQP1 (A) und NtAQP1_S129A (B) exprimierten, bei Verschiedenen intrazellulären pH Werten, im Vergleich zu Kontroll-Protoplasten (Ev), die mit dem leeren pYesDest52Vektor transformiert wurden. (C) Aus den Ratenkonstanten der Schwellkinetiken berechnete P_f -Werte ($n=30 \pm$ Standard-Fehler)

Nach Analyse der H_2O -Aufnahmeraten von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten zeigte sich, dass NtAQP1 in den Membranen keine erhöhte Wasserleitfähigkeit vermittelt im Vergleich zu den Kontrollprotoplasten (Abbildung II-24A/C). Die für NtAQP1 ermittelten Leitfähigkeiten präsentierten sich als pH-unabhängig und waren auch durch den Austausch der Aminosäure Serin an Position 129 nicht zu beeinflussen (Abbildung II-24B/C).

III Diskussion

1 Strukturelle Voraussetzungen für die Wasserleitung durch PIP

Durch die Aufklärung der Struktur des menschlichen AQP1 und des bakteriellen GlpF konnte der molekulare Mechanismus für die Leitung von H₂O-Molekülen und anderen Substraten wie z.B. Glycerin durch die Proteine aufgeklärt werden (Fu *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001). Die Selektivität eines Aquaporins ist demnach auf den Durchmesser der Pore und die spezifischen Interaktionen von einem Substrat-Molekül mit Aminosäuren in der Porenregion zurückzuführen. Es konnten zwei Bereiche innerhalb der Pore identifiziert werden, die für die Selektivität eines Aquaporins verantwortlich sind. Einen Selektivitätsfilter stellt die Region um die NPA-Motive dar (Abbildung III-1). Anhand einer computerberechneten Simulation wurde gezeigt, dass die Wassermoleküle in einer einzelnen Kette durch die Porenregion des AQP1 geleitet werden und infolge der Interaktion mit den Asparagin-Aminosäuren der NPA-Motive ihre Orientierung ändern (Tajkhorshid *et al.*, 2002). Hierdurch wird eine kontinuierliche H₂O-Molekül-Kette unterbrochen und die eventuelle Leitung von Protonen entlang der Wassermoleküle verhindert (Fujiyoshi *et al.*, 2002). Ein weiterer Selektivitätsfilter befindet sich oberhalb der NPA-Region. Die Verengung wird von vier tetraedrisch angeordneten Aminosäuren gebildet. In der Regel besteht dieser Bereich aus drei aromatischen Aminosäuren und einem Arginin (R), und wird demzufolge als Ar/R-Region bezeichnet (Abbildung III-1, (Fu *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2002). Beim menschlichen AQP1 besteht diese Zone neben dem Arginin aus einem Phenylalanin, einem Histidin und einem Cystein (Wallace and Roberts, 2004). Durch die tetraedrische Anordnung der vier Aminosäuren entsteht ein 2,8Å breiter Durchlass, der die Passage des H₂O-Moleküls mit einem Durchmesser von 2,4Å erlaubt und größere Moleküle ausschließt (Abbildung III-2).

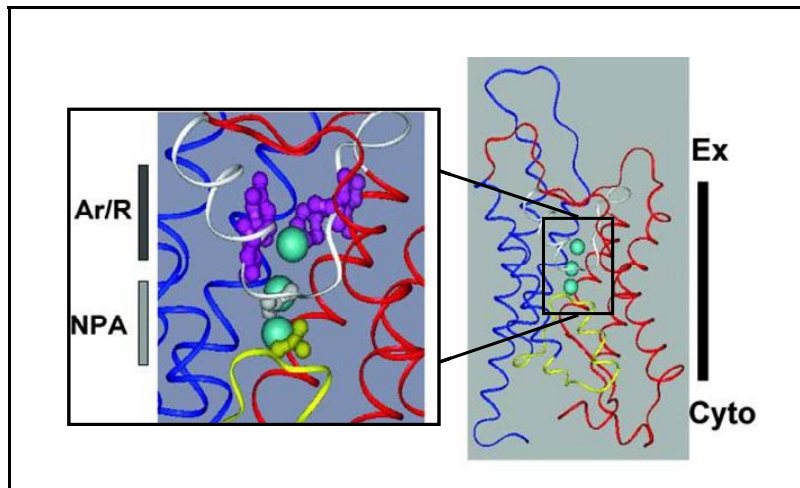


Abbildung III-1 Topologische Darstellung eines Aquaporins. Der Bildausschnitt zeigt vergrößert die möglichen Selektivitätsfilter für die H_2O -Leitung. Markiert sind die NPA-Region (Hellgrau) und die Ar/R-Region (Dunkelgrau). In Grün sind drei mit der Porenregion interagierend H_2O -Moleküle dargestellt (Wallace and Roberts, 2004).

Tritt ein H_2O -Molekül in den Kanal des Aquaporins ein, interagiert es mit dem Histidin, dem Arginin und dem Cystein. Durch die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen einem H_2O -Molekül und den Aminosäuren wird die Leitung einer einzelnen H_2O -Molekül-Kette energetisch ermöglicht. Zusätzlich bildet die positive Ladung der Arginin-Aminosäure eine Barriere für Protonen. Im Gegensatz zum wasserleitenden humanen AQP1 besteht die Ar/R-Region des bakteriellen GlpF aus den Aminosäuren Arginin, Tryptophan, Phenylalanin und Glycin (Abbildung III-2). In funktionellen Tests wurde für GlpF eine exklusive Glycerin-Leitfähigkeit nachgewiesen (Fu *et al.*, 2000). Durch die Anordnung der oben genannten Aminosäuren entsteht ein $3,6\text{\AA}$ großer Durchlass, der die Passage des im Vergleich zum H_2O -Molekül wesentlich größeren Glycerin-Moleküls erlaubt. Zudem interagieren das Phenylalanin und Tryptophan mit dem Kohlenwasserstoff-Gerüst des Glycerins, während das Arginin mit den Hydroxyl-Gruppen des Glycerins über eine Wasserstoff-Brückenbindung in Wechselwirkung steht. Daneben erhöhen das Phenylalanin und das Tryptophan die Hydrophobizität der Porenregion, wodurch die Passage von H_2O zusätzlich erschwert wird (Fu *et al.*, 2000). Zusammenfassend scheint die NPA-Region zusammen mit der Ar/R-Region eine nahezu unüberwindbare Barriere für Protonen darzustellen, während die Ar/R-Region zusätzlich die Substratspezifität eines Aquaporins bestimmt.

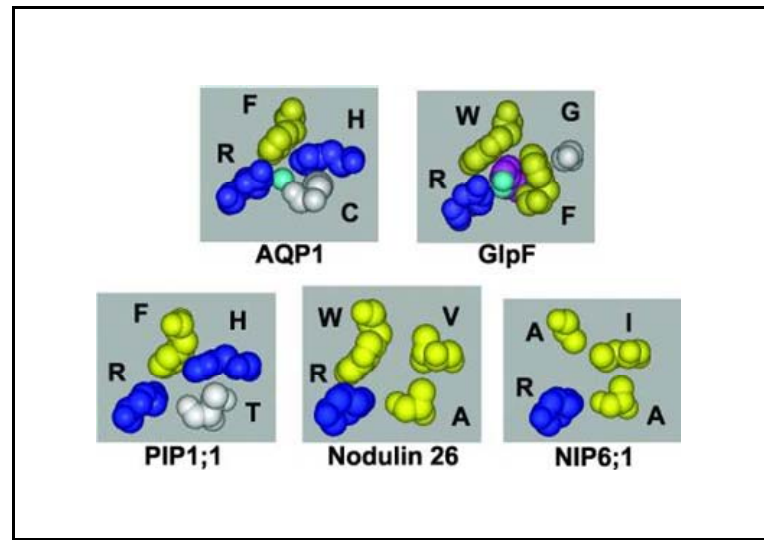


Abbildung III-2 Die Ar/R-Selektivitätsfilter von NIP und PIP Aquaporinen aus *Arabidopsis thaliana* in der Aufsicht von der extrazellulären Seite. In der Darstellung werden die Ar/R-Regionen von AQP1 und GlpF mit denen von AtPIP1;1, NOD26 und AtNIP6;1 verglichen. Die Aminosäuren sind durch ihre Buchstaben gekennzeichnet und basisch hydrophile blau, hydrophobe gelb und neutrale hydrophile weiß eingefärbt (Wallace and Roberts, 2004).

Durch die Modellierung der 35 Aquaporine von *Arabidopsis thaliana* wurden die Ar/R-Selektivitätsfilter der einzelnen Unterfamilien der pflanzlichen Aquaporine untersucht (Wallace and Roberts, 2004). Hierbei zeigten sich innerhalb der NIP- und TIP-Familie zwei bzw. drei unterschiedliche Aminosäure-Signaturen in der Ar/R-Region. Die Diversität innerhalb des Selektivitätsfilters dieser Unterfamilien lässt eine unterschiedliche Leitfähigkeit der Proteine und eine Beteiligung an verschiedenen physiologischen Vorgängen innerhalb der Pflanze vermuten. Tatsächlich konnte für einige Vertreter der TIP eine Leitfähigkeit, neben H_2O , für Harnstoff, Ammonium, Glycerin und Ammoniak, gezeigt werden (Gerbeau *et al.*, 1999; Klebl *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Holm *et al.*, 2005). Auch Proteine der NIP präsentierten sich in funktionellen Tests als multifunktionale Kanäle mit einer Leitfähigkeit für H_2O , Glycerin, Harnstoff und Ammoniak (Rivers *et al.*, 1997; Niemietz and Tyerman, 2000; Weig and Jakob, 2000; Wallace *et al.*, 2002; Klebl *et al.*, 2003).

Die Modellierung der 13 Vertreter der PIP-Familie aus *Arabidopsis thaliana* ergab nur eine Aminosäure-Signatur innerhalb der Ar/R-Region (Wallace and Roberts, 2004). Die Anordnung der Aminosäuren der PIP Proteine unterscheidet sich lediglich in dem Austausch des Cysteins mit einem Thyrosin zum humanen AQP1 (Abbildung III-2). Der Austausch sollte jedoch keine Auswirkung auf die H_2O -Leitfähigkeit der Proteine haben, da ein H_2O -Molekül mit der Carbonylgruppe der Peptidbindung der jeweiligen

Aminosäure interagiert (Sui *et al.*, 2001). Alle PIP besitzen somit in den Selektivitätsfiltern die strukturellen Voraussetzungen für eine hohe H₂O-Leitfähigkeit. Im Gegensatz dazu steht allerdings die Beobachtung, dass in funktionellen Tests Mitgliedern der PIP2-Unterfamilie eine hohe H₂O-Leitfähigkeit nachgewiesen werden konnte, während sich PIP1-Proteine als nahezu undurchdringlich für Wasser darstellten (Kammerloher *et al.*, 1994; Johansson *et al.*, 1998; Biela *et al.*, 1999; Chaumont *et al.*, 2000; Moshelion *et al.*, 2002; Bots *et al.*, 2005). Auch NtAQP1 und NtPIP2;1 als Vertreter der PIP1- bzw. PIP2-Unterfamilie aus Tabak zeigen diese unterschiedliche H₂O-Leitfähigkeit bei gleicher Aminosäure-Signatur in der Ar/R-Region und hoher Sequenzidentität innerhalb der gesamten Pore (Biela *et al.*, 1999; Bots *et al.*, 2005). Durch die Generierung von chimären Proteinen aus NtAQP1 und NtPIP2;1 sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob andere Domänen außerhalb der Porenregion am Mechanismus der H₂O-Leitung von PIP2-Aquaporinen verantwortlich sind. Der N-Terminus von NtPIP2;1 ist im Vergleich zu dem des NtAQP1 um 13 Aminosäuren verkürzt. Der Austausch des N-Terminus von NtAQP1 mit dem des NtPIP2;1 führte zu einer geringen aber signifikanten Erhöhung der H₂O-Leitfähigkeit des chimären Proteins. Somit kann dem N-Terminus zumindest eine Beteiligung an dem Mechanismus für eine H₂O-Leitung zugesprochen werden. Durch die Analyse von PIP-Aquaporinen aus *Arabidopsis thaliana* mittels Massenspektroskopie konnten vielfältige Modifikationen von Aminosäuren des N-Terminus von PIP1- und PIP2-Proteinen nachgewiesen werden (Santoni *et al.*, 2006; Maurel, 2007). Demnach erfahren die Aminosäuren Lysin und Glutamat an Position 2 bzw. 6 eines PIP2 (AtPIP2;1) eine posttranslationale Methylierung, während das initiale Methionin kotranslational abgespalten wird (Abbildung III-3A). Durch gerichtete Mutagenese der methylierten Aminosäuren und anschließenden funktionellen Tests konnte jedoch kein Beitrag zur Regulation der H₂O-Leitfähigkeit festgestellt werden. Die Analyse eines PIP1- (AtPIP1;1) Proteins ergab weder eine Methylierung von N-terminalen Aminosäuren, noch eine Abspaltung des Methionins (Abbildung III-3A). Stattdessen erfolgte hier eine Acetylierung des initialen Methionins (Santoni *et al.*, 2006). Allerdings wurden bisher die Auswirkungen der Acetylierung auf die Leitfähigkeit des PIP1-Aquaporins nicht weiter untersucht.

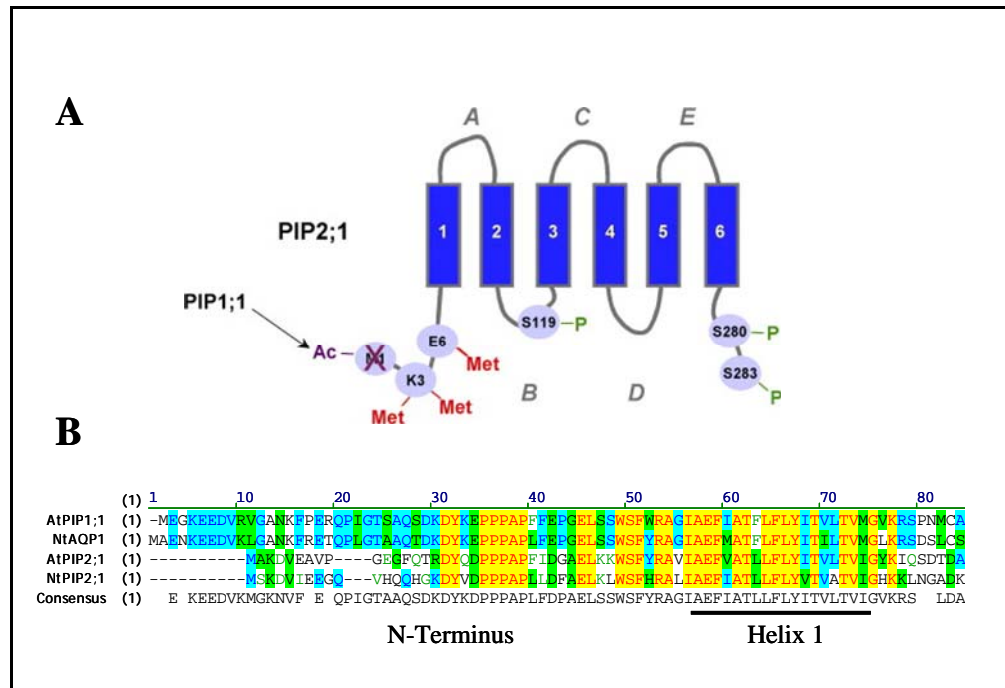


Abbildung III-3 (A) Schematische Darstellung der Topologie von AtPIP2;1. Die co- und posttranslationalen Modifikationen von AtPIP1;1 und AtPIP2;1 wurden durch Massenspektroskopie von Arabidopsis Membranproteinen aufgeklärt. Während bei AtPIP2;1 das initiale Methionin kotranslational abgespalten wird, erfährt es in AtPIP1;1 posttranslational eine Acetylierung. Weiterhin konnte bei AtPIP2;1 eine Methylierung der Lysin- und Glutamat-Aminosäuren am N-Terminus und die Phosphorylierung zweier Serin-Aminosäuren am C-Terminus nachgewiesen werden (Santoni *et al.*, 2003; Santoni *et al.*, 2006; Maurel, 2007). (B) Sequenzvergleich von NtAQP1 und NtPIP2;1 mit AtPIP1;1 bzw. AtPIP2;1 im Bereich des N-Terminus.

Durch Sequenzvergleiche der untersuchten PIP1- und PIP2-Aquaporine mit den hier behandelten NtAQP1 und NtPIP2;1 ist eine ähnliche co- bzw. posttranslationale Modifikation des N-Terminus möglich, zumal für eukaryotische Proteine bisher keine Consensus-Sequenz für die posttranslationale Acetylierung und Methylierung identifiziert wurde (Abbildung III-3B) (Polevoda and Sherman, 2003). Weitere strukturelle Domänen des NtPIP2;1 neben dem N-Terminus konnten aufgrund der fehlenden Expression von chimären Proteinen aus NtAQP1 und NtPIP2;1 in der Membran von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten nicht auf ihren Beitrag zu H₂O-Leitfähigkeit untersucht werden.

1.1 Weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der strukturellen Voraussetzung der H₂O-Leitung von PIP

Durch elektronen- und röntgenkristallographische Untersuchungen konnte ein Modell der molekularen Struktur eines PIP2-Aquaporins aus Spinat erstellt werden (Kukulski *et*

al., 2005; Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). Anhand des Modells konnten sowohl die strukturellen Voraussetzungen der H₂O-Leitung durch das Protein, sowie mögliche Regulationsmechanismen aufgeklärt werden. Für ein PIP1-Aquaporin liegen bisher keinerlei strukturelle Daten eines vor. Jedoch könnten durch den direkten Vergleich des atomaren Aufbaus von PIP1- und PIP2-Aquaporinen die strukturellen Grundlagen für die unterschiedlichen Leitfähigkeiten identifiziert werden.

Durch die Expression von NtAQP1 in der Hefe *Pichia pastoris* konnte in unserem Labor das Protein in den Mengen produziert werden, die für eine Kristallisation notwendig ist (B. Otto, pers. Mitteilung). In einer Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt wird nun versucht, durch Röntgenstrukturanalyse die Struktur von NtAQP1 aufzuklären.

2 Regulation der H₂O-Leitfähigkeit: Heteromerisierung von PIP-Aquaporinen

Nicht nur Unterschiede in der atomaren Struktur können die verschiedenen Leitfähigkeiten der PIP-Isoformen erklären. Auch posttranslationale Modifikationen und Protein-Protein-Interaktionen modulieren die Funktion von Aquaporinen. Eine Regulation durch Protein-Protein-Interaktion wird seit der Aufklärung der Struktur des humanen AQP1 und bakteriellen GlpF vermutet. Durch die Kristallisation und Modellierung des atomaren Aufbaus der beiden Aquaporine konnte gezeigt werden, dass sie in der Membran als Homotetramere vorliegen, indem jedes der vier Monomere eine Pore bereitstellt (Fu *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001). Mit der Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren der membran-durchspannenden α -Helices interagieren benachbarte AQP1-Monomere. Weiterhin scheinen Wechselwirkungen zwischen Loop A und D und den N- und C-Termini der einzelnen Monomere die Konformation des Tetramers zu beeinflussen (Murata *et al.*, 2000). Neben Homotetrameren wurden bei pflanzlichen Aquaporinen Heterotetramere aus verschiedenen Aquaporin-Isoformen nachgewiesen (Fotiadis *et al.*, 2001; Fetter *et al.*, 2004; Zelazny *et al.*, 2007). Durch „Crosslinking“-Experimente konnte z.B. die Interaktion von zwei Tonoplast-intrinsischen Proteinen aus der Linse (*Lens culinaris*) gezeigt werden (Harvengt *et al.*, 2000). Für PIP konnte die Heteromerisierung durch Kolo-kalisation-Experimente von Aquaporinen aus *Zea mays* gezeigt werden (Fetter *et al.*, 2004). Zudem führte sowohl die Koexpression unterschiedlicher PIP1-Isoformen als auch die gleichzeitige Expression von PIP1- und PIP2-Vertretern aus Mais in *Xenopus laevis*-Oozyten zu einer Steigerung der H₂O-Leitfähigkeit der Plasmamembran im Vergleich zur Expression einzelner Aquaporine (Fetter *et al.*, 2004). Die durchgeführten Arbeiten gaben allerdings keinen Hinweis darauf, in welchem Verhältnis die verschiedenen Aquaporin-Isoformen in einem Heterotetramer angeordnet sein müssen, um die H₂O-Leitfähigkeit zu modulieren. Außerdem konnte nicht zwischen der Interaktion von Homotetrameren oder von Monomeren innerhalb eines Heterotetramers unterschieden werden. Um diesen Aspekt zu untersuchen und den generellen Einfluss der Heterotetramerisierung auf die H₂O-Leitfähigkeit von NtAQP1 und NtPIP2;1 zu analysieren, wurden in der vorgelegten Arbeit künstliche Heterotetramere aus NtAQP1

und NtPIP2;1 erzeugt und im Hefesystem funktionell auf ihre Wasserleitfähigkeit untersucht. Es zeigte sich, dass *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten, die das Heterotetramer aus drei NtAQP1 und einem NtPIP2;1 exprimierten, eine ca. 40-fach höhere H₂O-Leitfähigkeit aufwiesen, als die Kontroll-Protoplasten. Vermutlich wird bei dieser Anordnung die H₂O-Leitfähigkeit nur durch das einzelne NtPIP2;1-Monomer vermittelt. Bestand das Heterotetramer jedoch aus NtAQP1- und NtPIP2;1-Monomeren im Verhältnis 2:2, erhöhte sich die H₂O-Leitfähigkeit, auf das Niveau des künstlichen NtPIP2;1-Homotetramer. Diese Anordnung von NtAQP1 und NtPIP2;1 in einem Heterotetramer scheint demnach zu einer Konformationsänderung der NtAQP1-Monomere führen, die eine H₂O-Leitfähigkeit des vorher nichtleitenden Kanals ermöglicht. Bei der Koexpression von PIP1- und PIP2-Aquaporinen aus Mais konnte eine Steigerung der Leitfähigkeit im Vergleich zur individuellen Expression festgestellt werden. Allerdings erklärten die Autoren die höhere Leitfähigkeit mit einem verstärkten Transport der PIP1 zur Plasmamembran (Fetter *et al.*, 2004). Ein Fehlen der gesteigerten Leitfähigkeit des Heterotetramers, wie es in bei den Koexpressions-Studien der PIP aus Mais beobachtet wurde, könnte bei den hier vorgelegten Arbeiten in der Konstruktion der künstlichen Heterotetramere begründet liegen. Eine fehlerhafte Transkription und Translation konnte durch die Funktionalität der künstlichen Heterotetramere bei den Schwellexperimenten von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten ausgeschlossen werden. Zur Herstellung der künstlichen Tetramere wurden die Aquaporin-Monomere N- und C-terminal verknüpft. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass eine vollständige Funktionalität der Tetramere frei bewegliche Termini erfordert. Durch die Aufklärung der atomaren Struktur von einigen Aquaporinen wurde gezeigt, dass die Termini der einzelnen Monomere in direkter Nachbarschaft liegen und dass eine Interaktion möglicherweise zur Stabilität des Tetramers beiträgt (Ringler *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2000; Kukulski *et al.*, 2005). Anhand der atomaren Struktur von SoPIP2;1 aus Spinat wurde zudem ein Schließmechanismus der Pore postuliert, der durch Wechselwirkung zwischen Aminosäuren des N-Terminus mit denen des Loop D eines Monomers vermittelt wird. Auch wird hierbei eine Interaktion des C-Terminus mit Aminosäuren des Loop D eines angrenzenden Monomers vermutet (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006).

2.1 Weiterführende Arbeiten zur Analyse der Modifikation der H₂O-Leitung von PIP durch Heteromerisierung

Der Beleg der Wasserleitung von NtAQP1 in einem künstlichen Heterotetramer wäre in zukünftigen Untersuchungen durch die Mutation von Aminosäuren in der Porenregion von NtPIP2;1 möglich. Durch die Mutagenese von Aminosäuren in der Porenregion von NtPIP2;1 könnte die Wasserleitung durch diese Proteine innerhalb des Heterotetramers verhindert werden. Die Wasserleitung der künstlichen Heterotetramere könnte demnach nur noch durch die funktionellen NtAQP1-Monomere vermittelt werden. Bei Untersuchungen der H₂O-Leitfähigkeit des humanen AQP1 resultierte der Austausch der Asparagin-Aminosäure des NPA-Motivs in Loop E durch Glutamin in der Reduktion der Wasserleitfähigkeit der *Xenopus* Oozyten auf das Niveau der mit H₂O injizierten Oozyten (Jung *et al.*, 1994).

Um das oben erwähnte mögliche Problem der direkten Fusion der N- Und C-Termini in den künstlichen Heterotetrameren zu umgehen, könnten bei weiteren Untersuchungen Proteaseschnittstellen zwischen den Monomeren eingefügt werden. Durch die Inkubation mit der spezifischen Protease werden somit die Monomere nachträglich voneinander getrennt. Die nun frei beweglichen Termini wären dann in der Lage mögliche Interaktionen innerhalb eines Monomers oder des Tetramers einzugehen.

In einem anderen Ansatz zur Untersuchung der Interaktion von verschiedenen Aquaporin-Isoformen in unserem Labor (Doktorarbeit Sven Sdorra), bedient man sich der Technik der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC, Abbildung III-4, (Citovsky *et al.*, 2006; Kerppola, 2006; Sung and Huh, 2007)). Hierzu wird ein PIP2-Aquaporin mit der C-terminalen Hälfte des Gelb-Fluoreszierenden Proteins (Yellow fluorescent protein, YFP) und ein PIP1 mit der N-terminalen Hälfte fusioniert. Bei einer Interaktion der beiden Fusionsproteine wird die Struktur des YFP komplettiert, was durch die spezifische Fluoreszenz angezeigt wird. Durch die Koexpression der beiden Proteine in *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen, könnte eine Interaktion der beiden Aquaporin-Isoformen durch die Fluoreszenz des komplettierten YFP in der Membran der Hefezellen nachgewiesen werden.

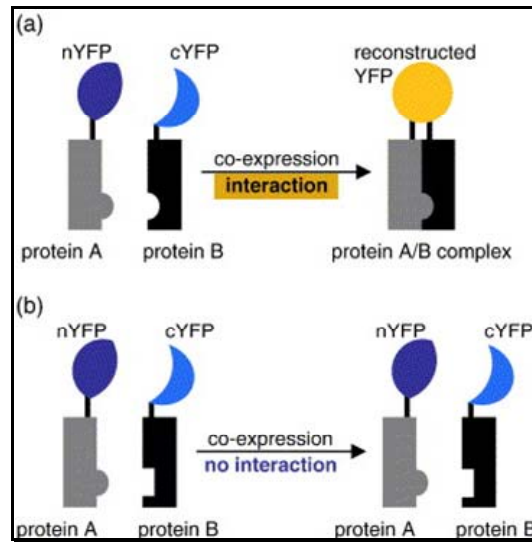


Abbildung III-4 Schematische Darstellung der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP). (a) Durch die Fusion der n- und C-terminalen Hälfte des YFP mit einem Protein A bzw. B kann ihre Interaktion durch die Komplettierung des YFP nach der Koexpression in *Saccharomyces cerevisiae* Zellen nachgewiesen werden. (b) Bei nicht-interagierenden Proteinen fehlt, nach der Koexpression, die Komplettierung des YFP und es wird dementsprechend keine Fluoreszenz in den Hefezellen zu detektieren sein (Citovsky *et al.*, 2006)

3 Regulation der H₂O-Leitfähigkeit: Aquaporin-„Gating“

In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Funktionalität von pflanzlichen Aquaporinen durch posttranslationale Modifikationen moduliert werden kann (Chaumont *et al.*, 2005; Kaldenhoff and Fischer, 2006; Maurel, 2007). Experimente mit Plasmamembranvesikel von *Arabidopsis thaliana* und *Beta vulgaris* zeigten einen Einfluss von Protonen und zweiwertigen Kationen (z.B. Ca²⁺) auf die H₂O-Leitfähigkeit (Gerbeau *et al.*, 2002; Alleva *et al.*, 2006). Hierbei konnte nach der Erhöhung der intravesikulären Protonen- bzw. Kalzium-Konzentration eine Reduktion der Wasserleitfähigkeit der Plasmamembran festgestellt werden. Die Identifizierung von zwei hoch konservierten Phosphorylierungsstellen in SoPIP2;1 (Ser115 und Ser274) offenbarte einen weiteren möglichen Regulationsmechanismus der H₂O-Leitung von PIP (Johansson *et al.*, 1998). Infolge Struktur-Funktions-Analysen an einem PIP2 (AtPIP2;2) aus *Arabidopsis thaliana* und der Aufklärung der atomaren Struktur von SoPIP2;1 wurde ein Modell für einen molekularen Mechanismus entwickelt, das ein generelles „Gating“ der Pore von Plasmamembran-intrinsischen Proteinen vermuten lässt (Abbildung II-15) (Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). Bei der Untersuchung von AtPIP2;2 konnte eine hoch konservierte Histidin-Aminosäure in Loop D als Ort der Wahrnehmung von Änderungen im zytosolischen pH Wert identifiziert und anhand der Modellierung von SoPIP2;1 bestätigt werden (Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). Die Protonierung vermittelt eine Konformationsänderung des Proteins, nach der Loop D den zytosolischen Eingang des Kanals verschließt. Hierbei bildet eine hoch konservierte Leucin- (Leu197) Aminosäure, die in direkter Nachbarschaft des Histidins in Loop D liegt, eine hydrophobe Barriere (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). Der geschlossene Zustand des Proteins wird durch zahlreiche ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäuren des Loop D und dem N-Terminus aufrechterhalten (Abbildung III-5). An diesem Netzwerk sind zwei saure Aminosäuren (Asp28 und Glu31 in SoPIP2;1) und zwei phosphorylierbare Serin-Aminosäuren (Ser115 und Ser274 in SoPIP2;1) beteiligt.

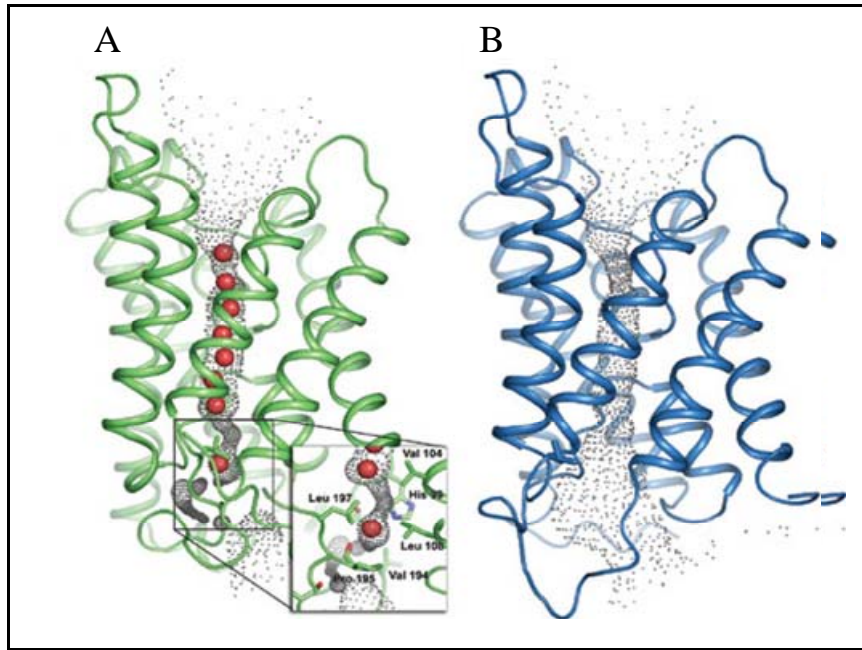


Abbildung III-5 Modell der atomaren Struktur von SoPIP2;1. (A) Konformation des geschlossenen SoPIP2;1. Vergrößert dargestellt ist die Region von Loop D und die interagierenden Aminosäuren Leu197, Pro195 und Val194 (B) Offene Konformation von SoPIP2;1. Durch eine Verlagerung von Loop D kann die H₂O-Leitung durch das Protein stattfinden. (Abb. aus (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006))

Übereinstimmend mit den experimentell gezeigten inhibitorischen Effekten von Kalzium auf die H₂O-Leitfähigkeit wird durch die Bindung eines zweiwertigen Kations (Cd²⁺ im modellierten SoPIP2;1) an Asp28 und Glu31 von SoPIP2;1 der geschlossenen Zustand stabilisiert (Abbildung III-6A) (Gerbeau *et al.*, 2002; Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung der Serin-Aminosäuren im Loop B (Ser115) und am C-Terminus (Ser274) induziert eine Konformationsänderung von Helix 5, wodurch die Wechselwirkungen zwischen Loop D und dem N-Terminus aufgehoben werden (Abbildung III-6B). Es kommt zu einer Verlagerung von Loop D, womit sich die Position von Leu197 vor dem Poreneingang verändert und die Wasserleitung durch das Protein stattfinden kann (Abbildung III-5B).

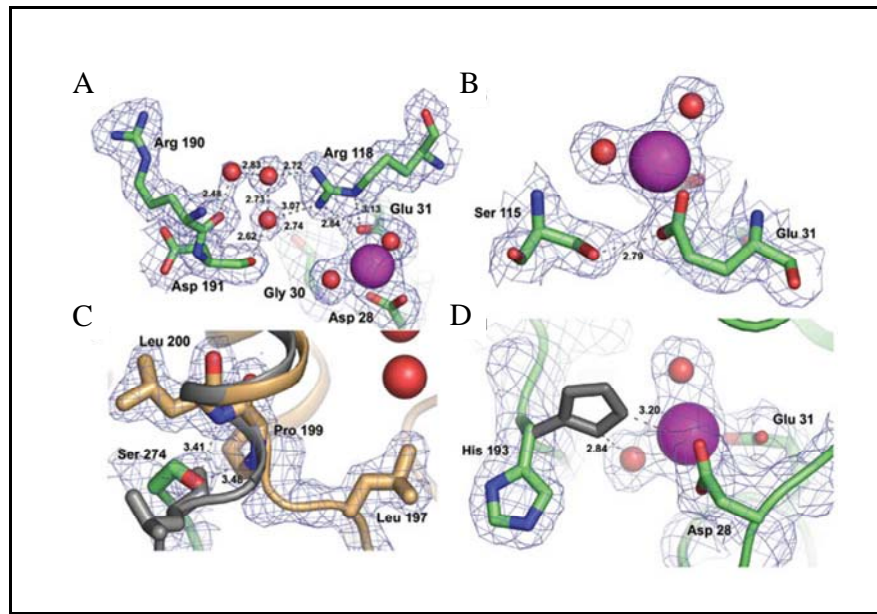


Abbildung III-6 (A) Vergrößerung der Bindungsstelle für das zweiwertige Kation in SoPIP2;1. Dargestellt ist das Cd^{2+} -Ion (violett) und das Netzwerk der Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen Gly30, Glu31, Arg118 und Arg190 bzw. Asp191 des Loop D von SoPIP2;1. (B) Vergrößerung des Phosphoserin an Position 115 und seine Wasserstoffbrücken-Bindung zu Glu31. (C) Vergrößerung des Phosphoserin an Position 277 und seine Interaktion mit Pro199 und Leu200 eines angrenzenden Monomers des SoPIP2;1 Tetramers. In Grau ist die Struktur des offenen Zustandes von SoPIP2;1 dargestellt, wenn Ser277 dephosphoryliert vorliegt (D) Vergrößerung von His193. Im protonierten Zustand (grau) interagiert His193 mit Asp28. (Abb. aus (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006))

Die Phosphorylierung von Ser274 verursacht hierbei vermutlich die Aufhebung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem C-Terminus und den Aminosäuren des Loop D eines angrenzenden Monomers, womit die Konformationsänderung eines angrenzenden Monomers ermöglicht wird (Abbildung III-6C). Die Protonierung von His193 durch die Erhöhung der intrazellulären H^+ -Konzentration erlaubt eine starke Wechselwirkung mit Asp28 (Abbildung III-6D). Infolge dessen wird Loop D, trotz phosphorylierter Ser115 und Ser274 vor der Porenregion positioniert und eine Wasserleitung unterbunden.

Das hier untersuchte NtPIP2;1 aus Tabak besitzt eine hohe Sequenzidentität zu dem modellierten SoPIP2;1 und die homologen Aminosäuren zu His193, Ser115 und Ser274 sind an Position 196, 118 bzw. 277 zu finden. Somit liegt ein ähnlicher regulatorischer Mechanismus für NtPIP2;1 nahe. Um die Bedeutung der Protonierung auf die H_2O -Leitfähigkeit von NtPIP2;1 und den regulativen Einfluss des hoch konservierten His (His196 in NtPIP2;1) zu untersuchen, wurde ein NtPIP2;1-Protein (NtPIP2;1-H196A) mit einem Aminosäureaustausch am His196 mit Alanin generiert. Zur Forcierung des

protonierten Zustandes von His196 wurde der zytosolische pH-Wert der Protoplasten vor den Schwellungsexperimenten gesenkt. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein-Bisacetat und einer vorherigen Eichung seiner pH-abhängigen Fluoreszenz konnten die zytosolischen pH-Werte der *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten bestimmt werden. Bei Messungen des intrazellulären pH-Wertes von verschiedenen *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen mit Hilfe von Fluorescein-Bisacetat, konnten bei pH_{out} 7,5 und 5 ein zytosolischer pH-Wert von 6,95-7 bzw. 6 ermittelt werden (Slavik, 1982, 1983; Haworth and Fliegel, 1993). Der teilweise Transport von Fluorescein in das saure Milieu der Vakuole könnte den in der hier vorgelegten Arbeit etwas niedrigeren Messwert für den intrazellulären pH-Wert (pH_i 6,46) bei pH_{out} 7,5 verursacht haben (Haworth *et al.*, 1991). Dennoch konnte sowohl nach der Inkubation der Protoplasten bei pH_{out} 5 als auch nach der Zugabe von Natrium-Essigsäure bei pH_{out} 5 die Herabsetzung des zytosolischen pH-Wertes nachgewiesen werden. Die Reduktion des zytosolischen pH Wertes bewirkte bei den Protoplasten, die das native NtPIP2;1 exprimierten, eine Reduktion der H_2O -Leitfähigkeit um 47%. Für die NtPIP2;1_H196A-Mutante konnte eine vom zytosolischen pH-unabhängige H_2O -Leitfähigkeit gemessen werden. Jedoch lag die osmotische Leitfähigkeit von NtPIP2;1_H196A um ca. 50% niedriger als die des unveränderten NtPIP2;1 bei pH_i 6,46. Durch „Western-Blot“-Experimente konnten sowohl das native als auch das mutierte NtPIP2;1-Protein in den Membranen der Hefe-Protoplasten nachgewiesen werden. Nach Vergleich der NtPIP2;1-Konzentration, konnte ein Unterschied in der H_2O -Leitfähigkeit durch ungleiche Expressionslevel der Aquaporine ausgeschlossen werden.

Bei den Versuchen mit einem PIP2-Aquaporin aus *Arabidopsis thaliana* (AtPIP2;2) in *Xenopus laevis*-Oozyten konnte nach der Reduktion des intrazellulären pH-Wertes von pH 7 auf pH 6 eine Reduktion der H_2O -Leitfähigkeit der Membran um ca. 85% festgestellt werden (Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Durch den Austausch des Histidins an Position 197 mit Alanin in AtPIP2;2 wurde die pH-Abhängigkeit der H_2O -Leitung aufgehoben, wodurch die Autoren die Histidin-Aminosäure als Ort der Wahrnehmung für Änderungen im zytosolischen pH-Wert identifizierten. Die hier vorgestellten Ergebnisse für NtPIP2;1 lassen eine vergleichbare Interpretation der Daten nicht zu. Eine Reduktion der H_2O -Leitfähigkeit des nativen NtPIP2;1 durch die Reduktion des

zytosolischen pH-Wertes konnte auch hier beobachtet werden. Jedoch zeigte die NtPIP2;1-Mutante mit dem Aminosäureaustausch am His196 (homolog zu His197 in AtPIP2;2) eine identische H₂O-Leitfähigkeit wie das native NtPIP2;1 bei pH_i 6,13. Nach dem postulierten „Gating“-Mechanismus für Plasmamembran-intrinsische Proteine sollte durch den Aminosäureaustausch des hoch konservierten Histidin das Protein in einem nicht-protonierten Zustand vorliegen und die Wasserleitfähigkeit müsste auf dem Niveau des nativen NtPIP2;1 bei pH_{out} 7,5 liegen. Durch die hier beobachtete Reduktion der H₂O-Leitfähigkeit von NtPIP2;1_H196A liegt eher eine Beteiligung des Histidins an den molekularen Grundlagen der H₂O-Leitung durch den Kanal nahe als eine Wahrnehmung des zytosolischen pH Wertes. Die Reduktion der H₂O-Leitfähigkeit durch die Herabsetzung des intrazellularen pH-Wertes lässt einen bis jetzt unbekannten Mechanismus zur Regulation der Funktion von NtPIP2;1 durch Protonierung vermuten. Neben dem konservierten Histidin an Position 196 in NtPIP2;1 ist eine weitere konservierte Histidin-Aminosäure am N-terminalen Ende von Helix 6 zu finden. In AtPIP2;2 hatte die Mutation des homologen Histidins keinerlei Einfluss auf die Funktion und die pH-Abhängigkeit der Wasserleitung durch das Protein (Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu AtPIP2;2 findet man am C-Terminus von NtPIP2;1 noch drei weitere dem Zytosol zugewandte Histidin-Aminosäuren, die durch ihre Protonierung die Änderungen im intrazellularen pH-Wert wahrnehmen könnten. Weiterhin enthält Loop D von NtPIP2;1 neben dem konservierten Histidin weitere Aminosäuren, die durch ihre Ladung eine Verringerung des intrazellularen pH-Wertes detektieren könnten. Durch Mutagenese der Arginin- oder Aspartat-Aminosäure an Position 194 bzw. 195 in AtPIP2;2 konnte eine vergleichbare Reduktion der pH-Abhängigkeit der H₂O-Leitung durch das Protein gezeigt werden (Tournaire-Roux *et al.*, 2003).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des postulierten „Gating“-Mechanismus ist die posttranslationale Modifikation von zwei Serin-Aminosäuren an Position 115 und 274 in SoPIP2;1. Durch die Mutation der Serin-Aminosäure an Position 118 und auch die gleichzeitige Mutation des Ser277 in NtPIP2;1 wurde die H₂O-Leitfähigkeit auf das Niveau der Kontroll-Protoplasten gesenkt. Die Expression der mutierten NtPIP2;1-Proteine in der Membran konnte durch die Hybridisierung mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Hier konnten Expressionsunterschiede als mögliche

Ursache für die unterschiedlichen Leitfähigkeiten ausgeschlossen werden. Erstaunlicherweise hatte die Inkubation mit dem Kinase-Inhibitor K252a und dem Phosphatase-Inhibitor Okadasäure vor den Schwellexperimenten keinerlei Einfluss auf die Wasserleitfähigkeit der Protoplasten, die das native NtPIP2;1-Protein exprimierten. K252a inhibiert ein breites Spektrum an Proteinkinasen in *Saccharomyces cerevisiae*, wie z.B. Protein-Kinase A oder Protein-Kinase C (Kase *et al.*, 1987; Tischler *et al.*, 1990; Bishop *et al.*, 2000). Okadasäure blockiert dagegen die Protein-Phosphatase 2A und im geringen Maße auch Protein-Phosphatase 1 (Cohen, 1989; Zhao *et al.*, 1997). Einen generellen Einfluss der Inhibitoren auf Kinasen bzw. Phosphatasen des hier verwendeten *Saccharomyces cerevisiae*-Stammes SY1 konnte mit Hilfe eines Phosphoprotein-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Eine Inkubation mit dem Kinase-Inhibitor hätte bei einer Modulation von NtPIP2;1 durch Phosphorylierung eine Reduktion der H₂O-Leitfähigkeit zur Folge gehabt. Die beobachtete Herabsetzung der H₂O-Leitfähigkeit der NtPIP2;1_S118A Mutante ist demnach eher in der Zerstörung der strukturellen Vorraussetzung für die H₂O-Leitung des Aquaporin-Monomers oder -Tetramers begründet, als in der Dephosphorylierung des Proteins. Der Aminosäureaustausch der zweiten möglichen Phosphorylierungsstelle am Serin an Position 277 in NtPIP2;1 (homolog zu Ser274 in SoPIP2;1) führte unerwartet zu einer 50%igen Steigerung der H₂O-Leitfähigkeit im Vergleich zum nativen NtPIP2;1. Eine regulative Phosphorylierung von Ser277 würde demnach im nativen NtPIP2;1 eine Öffnung der Pore vermitteln. Allerdings wird diese Vorstellung der Regulation der H₂O-Leitfähigkeit von NtPIP2;1 nicht von den Resultaten der Inhibitorstudien (siehe oben) getragen. Durch die mögliche Interaktion von Ser277 von SoPIP2;1 mit dem Loop D eines angrenzenden Monomers scheint in NtPIP2;1 das Phosphoserin möglicherweise zur Stabilität des Tetramers beizutragen (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006).

Eine von SoPIP2;1 differenzierte Regulation von NtPIP2;1 wird auch nach den Messungen der H₂O-Leitfähigkeit der funktionellen NtPIP2;1-Mutanten bei reduziertem zytosolischen pH offensichtlich. Dem postulierten „Gating“-Mechanismus geht die Phosphorylierung der beiden Serin-Aminosäuren voraus. Ein dephosphoryliertes Protein sollte demnach keinerlei H₂O-Leitung zeigen. Zudem unterstützt die Protonierung des konservierten Histidins in Loop D den geschlossenen Zustand des

Proteins. Durch die Expression von NtPIP2;1_S277A konnte jedoch sowohl eine Erhöhung als auch eine pH-Abhängigkeit der H₂O-Leitfähigkeit festgestellt werden. Die gleichzeitige Mutation des Ser277 und His196 von NtPIP2;1 senkte die H₂O-Leitfähigkeit auf das Niveau der NtPIP2;1_H196A-Mutante. Aufgrund der auch hier fehlenden pH-Abhängigkeit der Leitfähigkeit wird durch die Doppel-Mutation die Funktion des His196 als generelle strukturelle Voraussetzung für die Wasserleitung durch das Protein bestätigt.

Die Aminosäuren, die für den „Gating“-Mechanismus verantwortlich scheinen, sind hoch konserviert in pflanzlichen PIP (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). Somit findet man auch in NtAQP1 eine zu Ser118 und His196 in NtPIP2;1 homologe Phosphorylierungs- (Ser129) bzw. Protonierungsstelle (His207). Eine zweite mögliche Phosphorylierungsstelle im C-Terminus fehlt dagegen. In den funktionellen Untersuchungen bedingte NtAQP1 keine gesteigerte H₂O-Leitfähigkeit im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Einfluss auf die Leitfähigkeit hatte weder der Aminosäureaustausch des Ser129 mit Alanin, noch die Herabsetzung des intrazellularen pH-Wertes. Hier bleibt zu untersuchen, ob die für NtAQP1 nachgewiesenen Leitfähigkeiten für CO₂ (Uehlein *et al.*, 2003) und Glycerin (Biela *et al.*, 1999) von dem Austausch der möglichen Phosphorylierungsstelle beeinflusst werden.

Die in dieser Arbeit gezeigten Modulation der H₂O-Leitfähigkeit von NtAQP1 durch die Interaktion mit NtPIP2;1, lässt eine Multifunktionalität von NtAQP1 abhängig von seinem Vorkommen im Hetero- bzw. Homotetramer vermuten. Vorläufige Ergebnisse einer parallelen Untersuchung zur CO₂-Permeabilität von NtAQP1, zeigten einen Verlust der CO₂-Leitfähigkeit von NtAQP1 im künstlichen Heterotetramer (Doktorarbeit Nadine Pede). In früheren Arbeiten konnte für transgene Tabakpflanzen mit vermindertem NtAQP1-Proteingehalt sowohl eine Reduktion der hydraulischen Leitfähigkeit der Wurzeln, als auch eine Abnahme der Photosyntheserate festgestellt werden (Siefritz *et al.*, 2002; Uehlein *et al.*, 2003). Zusammen mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen suggerieren die Daten ein gewebespezifisches Vorkommen von NtAQP1 im Homo- bzw. Heterotetramer. Während NtAQP1 mit einem PIP2-Protein im Heterotetramer in den Wurzeln zur H₂O-Leitung befähigt scheint, erhöht es in den Blättern im Homotetramer die Leitfähigkeiten der Membranen für CO₂.

Zusammenfassend bleibt nach den hier vorgestellten Ergebnissen eine von SoPIP2;1 verschiedene Regulation der H₂O-Leitung von NtAQP1 und NtPIP2;1 festzustellen. Während für NtAQP1 eine Modulation der H₂O-Leitfähigkeit durch Heteromerisierung nachgewiesen werden konnte, scheint NtPIP2;1 konstitutiv zur Wasserleitung befähigt. Jedoch wird die Funktion von NtPIP2;1, aufgrund eines noch unbekannten Mechanismus, durch die Steigerung der intrazellulären Protonen-Konzentration beeinflusst. Die Allgemein-Gültigkeit des für SoPIP2;1 postulierten „Gating“-Mechanismus für Plasmamembran intrinsische Proteine ist demnach nicht mehr haltbar. Trotz der hohen Sequenzhomologien zwischen PIP1- und PIP2-Aquaporinen ist ein differenzierter Blick auf die Funktionen und Regulationsmechanismen der einzelnen Isoformen nötig. Die Einzigartigkeit der PIP Proteine zeigte sich auch schon bei Arbeiten mit *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, die einen Defekt in einem Gen eines PIP2-Proteins trugen. Obwohl die Sequenzhomologie zwischen den Vertretern der PIP2-Familie in *Arabidopsis thaliana* bei über 90% liegt, konnte der Phänotyp, den das einzelne defekte Gen verursachte, nicht durch andere PIP2-Isoformen kompensiert werden (Javot *et al.*, 2003).

3.1 Weiterführende Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation der Funktion von pflanzlichen PIP

Im Gegensatz zu SoPIP2;1 besitzt NtPIP2;1 weitere für zytosolische Proteine zugängliche Serin- und Histidin-Aminosäuren, die durch Phosphorylierung bzw. Protonierung eine Konformationsänderung des Proteins vermitteln könnten. Durch ortsgebundene Mutagenese gilt es in zukünftigen Studien zu überprüfen, ob diese Aminosäuren an einer Modulation der H₂O-Leitfähigkeit beteiligt sind.

Des Weiteren könnte nach der Aufreinigung des NtPIP2;1-Proteins eine massenspektroskopische Untersuchung Klarheit über den Modifizierungs-Zustand des Proteins liefern. Hier würden sich Kooperationen mit dem Institut für Chemie an der TU Darmstadt oder mit dem Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt anbieten, die über die nötigen apparativen Bedingungen verfügen.

IV Material und Methoden

1 Verwendete Organismen und Plasmide

1.1 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Tabelle 2 In dieser Arbeit verwendeter *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm

S. cerevisiae	Genotyp	Herkunft
SY1	MAT α , ura3-52, leu2-3,112, his4-619, sec6-4, GAL	J. Brodsky (Nakamoto <i>et al.</i> , 1991)

1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 3 In dieser Arbeit verwendete *E.coli*-Stämme

E. coli	Genotyp	Herkunft
XL1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Protagen
DB 3.1	F- gyrA462 endA1 (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 - leu mtl1	Invitrogen

1.3 Verwendete Plasmide

1.3.1 Plasmide zur Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Tabelle 4 Verwendete Hefeexpressionsvektoren

Plasmide	Beschreibung	Herkunft
pYesDest52®	N-terminal poly-Histidin/V5-Epitop-Fusionsvektor, Gal1-promotor, Amp-Resistenz, Gateway System LR-Reaktion	Invitrogen
pYes2/CT®	N-terminal poly-Histidin/V5-Epitop-Fusionsvektor, Gal1-promotor, Amp-Resistenz, Multiple Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen	Invitrogen

1.3.2 Gateway- und Klonierungsplasmide

Tabelle 5 Verwendete Klonierungsplasmide

Plasmide	Beschreibung	Herkunft
pDonr201®	Gateway System BP-Reaktion, Kan-Resistenz	Invitrogen
pCR2.1®	T/A-Vektor, Multiple Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, Kan-/Amp-Resistenz	Invitrogen
pDrive®	T/A-Vektor, Multiple Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, Kan-/Amp-Resistenz	Qiagen

1.4 Synthetische Oligonukleotide

1.4.1 Primer für künstliche Heterotetramere

Tabelle 6 Verwendete synthetische Oligonukleotide zur Herstellung artifizierlicher Aquaporin-Tetramere

Name	Sequenz 5'-3'	Schmelz-Temperatur (T _m) [°C]	Firma
Eco47III_NtAQP1_s	AGCGCTATGGCAGAAAAGAAAGAAGAAG	63,7	MWG
XhoI_NtAQP1_as	CTCGAGAGACGACTTGTGGAATGG	64,4	MWG
BamHI_NtAQP1_s	GGATCCATGGCAGAAAACAAAGAAGAAG	63,7	MWG
Eco47III_NtAQP1_as	AGCGCTAAGACGACTTGTGGAATGGA	64,8	MWG
KpnI_NtAQP1_s	AAA GGT ACC ATG GCA GAA AAC AAA GAA G	62,2	MWG
BamHI_NtAQP1_as	AAA GGA TCC AGA CGA CTT GTG GAA TG	63,2	MWG
XhoI_NtPIP2;1_s	TATCTCGAGATGTCAAAGGACGTGATTGAA G	65,5	MWG
XbaI_NtPIP2;1_as	TAATCTAGATTAGTTGGTTGGGTTACTGCG	64	MWG
Eco47III_NtPIP2;1_s	AAAAGCGCTATGTCAAAGGACGTGATTG	63,7	MWG
XhoI_NtPIP2;1_as	AAACTCGAGGTTGGTTGGGTTACTGC	64,8	MWG
BamHI_NtPIP2;1_s	AAAGGATCCATGTCAAAGGACGTGATTGA AG	65,5	MWG
Eco47III_NtPIP2;1_as	AAA AGC GCT GTT GGT TGG GTT ACT GC	64,8	MWG
KpnI_NtPIP2;1_s	AAA GGT ACC ATG TCA AAG GAC GTG ATT G	63,7	MWG
BamHI_NtPIP2;1_as	AAA GGA TCC GTT GGT TGG GTT ACT GC	64,8	MWG

1.4.3 Primer für die Mutagenese von NtAQP1 und NtPIP2;1

Tabelle 10 Primer für die gerichtete Mutagenese von einzelnen Aminosäuren von NtAQP1 und NtPIP2;1

Name	Sequenz 5'-3'	Schmelz-Temperatur (T _m) [°C]	Firma
NtAQP1-S129A_s	CTTGGCAAGGAACTGGCCTTAACCAGGGC	70,9	MWG
NtAQP1-S129A_as	GCCCTGGTTAAGGCCAGTTTCCTTGCCAAG	70,9	MWG
NtPIP2;1-S118A_s	CTTAGCAAGAAAAGTGGCATTGTAAAGAGCAGTGGG	69,5	MWG
NtPIP2;1-S118A_as	CCCACTGCTCTTAACAATGCCACTTTTCTTGCTAAG	69,5	MWG
NtPIP2;1-S277A_s	CAATTAAGGCATTGGGTGCTTTCGGCAGTAACCCA	70,5	MWG
NtPIP2;1-S277A_as	TGGGTTACTGCGGAAAGCACCCAATGCCTTAATTG	70,5	MWG
NtPIP2;1-H196A_s	GTGCCCCGTGACTCCGCTGTCCCTGTTTTGG	73,6	MWG
NtPIP2;1-H196A_as	CCAAAACAGGGACAGCGGAGTCACGGGCAC	73,6	MWG

1.4.4 Primer für die Klonierung mit dem Gateway®-System

Tabelle 11 Primer für die Klonierung der cDNA von NtAQP1 und NtPIP2;1 in einen Hefeexpressionsvektor mit Hilfe der Gateway®-Technologie

Name	Sequenz 5'-3'	Schmelz-Temperatur (T _m) [°C]	Firma
attB1-NtAQP1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGA AGG AGA TAG AAC CAT GGC AGA AAA CAA AGA AGA AGA TGT TAA GCT TGG	70	MWG
attB2-NtAQP1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT TAAGACGACTTGTGGAATGG	67	MWG
attB1-NtPIP2;1	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCG AAGGAGATAGAACCATGTCAAAGGACGTGA TTGAAGAAGG	58,6	MWG
attB2-NtPIP2;1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT TAGTTGGTTGGGTTACTGCG	68,0	MWG

1.4.5 Primer für Sequenzierungen

Tabelle 12 Primer für die Sequenzierung von cDNA im Hefeexpressionsvektor pYes-Dest52 oder den Klonierungsplasmide pCR2.1 und pDrive

Name	Sequenz 5'-3'	Schmelz-Temperatur (T _m) [°C]	Firma
Gal1_forw.	AATATACCTCTATACTTTAACGTC	54,2	MWG
Cyc1_rev.	GCGTGAATGTAAGCGTGAC	56,7	MWG
M13_forw	GAAACAGCTATGACCATGATTACGCC	63,2	MWG
M13_rev	GACGTTGTAAAACGACGGCCAG	62,1	MWG

2 Medien

Alle Medien wurden in H₂O bidest angesetzt und bei 120°C für 15 min autoklaviert.

2.1 Medien zur Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

YPD (1l)	1% Hefeextrakt 2% Pepton 2% Glukose
YPD-Agarmedium	YPD-Medium + 2% Agar
SC+glu (-Ura) Medium (1l)	0,17% Yeast Nitrogen Base 0,5% Ammoniumsulfat 0,115% -Ura Aminosäure-Mix 2% Glukose
SC+gal (-Ura) Medium (1l)	0,17% Yeast Nitrogen Base 0,5% Ammoniumsulfat 0,115% -Ura Aminosäure-Mix 2% Galaktose
SC+gal/+glu (-Ura) Agarmedium	SC+gal/+glu (-Ura) Medium + 2% Agar
-Ura Aminosäuren-Mix	0,1g Adenine, Arginin, Cystein, Lysin, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan 0,05g Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin

2.2 Medien zur Anzucht und Transformation von *Escherichia coli*

LB Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl Nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C entsprechendes Antibiotikum zufügen: 50µg/µl Ampicilin 50µg/µl Kanamycin
LB-Agarmedium	LB-Medium + 1% Agar
SOC-Medium	2% Trypton 0.5% Hefeextrakt 10mM NaCl 2.5mM KCl 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ 20mM Glucose pH 7.0

2.3 Medien zur Protoplastierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Inkubationspuffer (Puffer A)	50mM KH ₂ PO ₄ mit KOH auf pH 7,2 eingestellt, 0,2% β-Mercaptoethanol
Protoplastierungspuffer (Puffer B)	Puffer A mit 2,4M Sorbitol, 0,01- 0,03mg/ml Zymolyase (20T), 25mg/ml BSA (Sigma), 0,2% β-Mercaptoethanol

2.4 Medien zur Messung der Wasserpermeabilität der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* mittels „Stopped-Flow“-Spektrometrie

SF („Stopped-Flow“-Puffer 1	1,8M 50mM 5mM 10mM	Sorbitol NaCl CaCl ₂ Tris/HCl pH 7,5
SF („Stopped-Flow“-Puffer 2	1,8M 50mM 5mM 10mM	Sorbitol NaCl CaCl ₂ Mes/KOH pH 5
M (Misch)-Puffer 1	1,2M 50mM 5mM 10mM	Sorbitol NaCl CaCl ₂ Tris/HCl pH 7,5
M-Puffer 2	1,2M 50mM 5mM 10mM	Sorbitol NaCl CaCl ₂ Mes/KOH pH 5

3 Verfahren mit *Escherichia coli* (*E.coli*)

3.1 Kultivierung von *E.coli*

Bakterien-Kolonien mit rekombinanten Plasmiden wurden in 3 ml LB-Medium, ergänzt mit Antibiotikum, über Nacht bei 37°C und 300 rpm in einem Schüttelinkubator angezogen. Die Wahl des Antibiotikums richtete sich nach der Resistenz des rekombinanten Plasmids. Die Anzucht erfolgte in hitzesterilisierten Reagenzgläsern.

3.2 Erstellen von Dauerkulturen von *E.coli*

Für eine Dauerkultur von *E.coli* wurden in einem 1.5ml Reaktionsgefäß, 500µl einer Über-Nacht-Kultur von *E.coli* mit 500µl einer 90% Gyzerinlösung versetzt. Nach kurzem Mischen wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

3.3 Transformation von *E.coli* nach der CaCl₂/Hitzeschock-Methode

Die Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* erfolgte nach der CaCl₂-Methode von (Bignell and Evans, 1996).

Zur Transformation wurden 10ng Plasmid-DNA mit 50µl kompetenten *E.coli*-Zellen gemischt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und der anschließende Hitzeschock für 45s in ein Wasserbad mit 42°C durchgeführt. Nach 2min Inkubation auf Eis wurden 0,25ml SOC-Medium hinzugegeben. Zur Expression der für die Antibiotiker-Resistenz erforderlichen Proteine erfolgte eine 1h Inkubation bei 37°C und 200rpm. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert und in 100µl SOC-Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde im Folgenden auf LB-Agarmedium mit Antibiotikum ausplattiert und für 12h bei 37°C inkubiert.

3.4 Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli*

Dem verwendeten Verfahren zur Gewinnung von Plasmid-DNA liegt ein alkalischer Aufschluss der Bakterien zugrunde. Aus dem Lysat lassen sich bakterielle Proteine und genomische DNA selektiv durch Erniedrigung des pH-Wertes fällen. Im Überstand verbleibt die Plasmid-DNA.

Von einer *E.coli*-Übernachtskultur wurden 1,5ml entnommen und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur 30sec. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 300µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300µl Puffer P2 und nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen innerhalb von 5min bei Raumtemperatur (RT) lysiert. Nach Hinzufügen von 300µl eiskaltem Puffer P3 und vorsichtigem Mischen erfolgte eine 10min Inkubation auf Eis. Durch Zentrifugation (15min, 14000rpm, RT) wurden anschließend genomische DNA und Proteine pelletiert. Die Plasmid DNA wurde durch Zugabe von 800µl Isopropanol zu 700µl Überstand präzipitiert. Um Salze zu entfernen, wurde die gefällte Plasmid DNA mit 500µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in H₂O bidest. oder TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

P1 (Resuspensionspuffer)	50mM 10mM 100µg/ml	Tris/HCl pH8 MEDTA RNaseA
P2 (Lysepuffer)	200mM 1%	NaOH SDS
P3 (Neutralisationspuffer)	3M	Kaliumacetat (pH 5.5)

4 Verfahren mit *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*)

4.1 Kultivierung von *S.cerevisiae*

Wenn nicht anders beschrieben wurde der *S.cerevisiae*-Stamm SY1 in YPD-Medium kultiviert. Hierzu wurden 25ml YPD-Medium mit einer Hefekolonie (\varnothing ca. 3mm) unter sterilen Bedingungen angeimpft und bei 250rpm für 12-16h und 30°C inkubiert.

4.2 Erstellen einer Dauerkultur von *S.cerevisiae*

Für die dauerhafte Kultivierung wurde eine Übernachtskultur der Hefezellen angelegt. Ein Volumen der Hefekultur wurde in einem 1,5ml Reaktionsgefäß mit dem gleichen Volumen einer 40% Glycerinlösung vermischt und bei -80°C gelagert.

4.3 Biolistische Transformation von *S.cerevisiae*

Zur biolistischen Transformation von SY1-Hefezellen wurde das „Particle-Delivery-System“ (PDS) 1000/He (Biorad) verwendet. Hierzu wurde eine Kultur des SY1-Stammes in YPD-Medium angelegt und für 48h bei 30°C inkubiert. Die *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen sollten sich in der stationären Wachstumsphase befinden. Durch Zentrifugation (5min, 500xg, RT) wurden die Hefezellen geerntet, mit autoklavierten H₂O gewaschen und in 3ml autoklavierten H₂O aufgenommen. 100µl der Hefesuspension wurden in die Mitte einer Petrischale mit SC+glu (-Ura)-Agarmedium, komplettiert mit 0,75M Sorbitol (Applichem) und 0,75M Mannitol (Applichem), gegeben und in einem Radius von 2cm plattiert. Die so präparierten Hefezellen wurden nach Verflüchtigen des H₂O zur Transformation verwendet. Für die Beschichtung der Wolfram-Mikropartikel mit Plasmid-DNA und die anschließende Transformation der Hefezellen wurde nach dem Protokoll beschrieben in (Sanford *et al.*, 1993) vorgegangen.

4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S.cerevisiae*

Um eine größere Menge Plasmid-DNA aus Hefen isolieren zu können, müssen diese zuerst Protoplastiert (siehe Kap. 4.5) werden. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgt über Bindung an eine Silicasäule. Hierzu wurden 15ml der Über-Nacht-Kultur des

Hefestammes für 3 Minuten bei 500xg zentrifugiert, das Pellet in 1ml 0,9M Sorbitol/0,1M EDTA resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation der Zellsuspension für 30 Sekunden bei 3000rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 0,4ml 0,9M Sorbitol/0,1M EDTA/0,2% Mercaptoethanol resuspendiert und mit 0,1ml einer Zymolyase-Stammlösung (2mg/ml) versetzt. Es folgte eine Inkubation für 40 Minuten bei 30°C um der Zymolyase die Spaltung der Hefezellwände zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz für 5min bei 500xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach der Anleitung des Plasmid-Midiprep-Kits von Peqlab. Nachdem die Protoplasten in 0,5ml Resuspensionspuffer vollständig resuspendiert wurde erfolgte die Zugabe von 0,5ml Lysepuffer. Nach 2 Minuten bei RT wurde der Neutralisierungspuffer zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren sorgfältig gemischt. Um eine vollständige Präzipitation von Proteinen und genomischer DNA zu gewährleisten, erfolgte eine einstündige Inkubation bei 4°C. Zur Entfernung der präzipitierten Proteine wurde der Ansatz bei 14000rpm für 15 Minuten in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5415 C) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine Silikat-Säule (Peqlab) überführt. Die Plasmid-DNA wurde nach dem Midiprep-Kit-Protokoll (Peqlab) aufgereinigt.

4.5 Protoplastierung von *S cerevisiae*

Der Zellwandabbau von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen erfolgte mit Hilfe des aus *Arthrobacter luteus* gewonnenen Enzymgemisches Zymolyase. Neben β 1,3-Glucanasen enthält das Enzymgemisch auch Proteasen, welche die zu untersuchenden Kanalproteine schädigen können. Um das zu verhindern, müssen beim Abbau der Zellwand andere, durch Proteasen spaltbare Substrate wie zum Beispiel Rinderserumalbumin (BSA) im Überschuss zugesetzt werden. Die Protoplastierung der Hefezellen erfolgte nach dem von Bertl *et al.*, 1998 veröffentlichten Protokoll. 10ml einer Hefekultur wurden bei 2000rpm für 5 Minuten in einer Beckmann-Zentrifuge zentrifugiert, in 3ml Puffer A resuspendiert und für 15 Minuten bei 30°C und 200rpm inkubiert. Nach Zugabe von 4ml Puffer B wurde der Zellsuspension Zymolyase 20T und BSA bis zu einer Endkonzentration von 0,03mg/ml (Z20T) bzw. 25mg/ml (BSA) zugesetzt. Um ein effektives Aufbrechen der Hefezellwand zu erreichen, erfolgte eine

Inkubation dieses Ansatzes bei 30°C und 200rpm für 45 Minuten. Nach erneuter Zentrifugation (3000rpm, RT, 5min) wurden die Hefezellen in SF-Puffer1 oder 2 resuspendiert.

4.6 Bestimmung der Größe von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten

Die Bestimmung der Größe der Protoplasten wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen einer Über-Nacht-Kultur protoplastiert und in SF-Puffer1 aufgenommen. Ein Aliquot der protoplastierten Zellen wurde in eine Thoma-Kammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Von den Protoplasten wurden mit einer Digitalkamera (Canon S80) Bilder aufgenommen und digital gespeichert. Mit der Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) wurde anschließend die Größe der Protoplasten bestimmt.

4.7 Messung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten (P_f) der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* mittels „Stopped-Flow“-Spektrometrie

4.7.1 „Stopped-Flow“-Spektrometrie

Ein „Stopped-Flow“-Experiment beinhaltet grundsätzlich das schnelle Mischen zweier (oder mehrerer) Lösungen und die sofortige spektrometrische Beobachtung der Reaktion.

Die hier verwendete Apparatur der Firma BioLogic besteht aus zwei funktionellen Einheiten, der Mischeinheit (SFM 300) und der Detektionseinheit (MOS250) (Abbildung IV-1). Für die Messung bei verschiedenen Temperaturen war die Mischeinheit an einen Thermostaten angeschlossen. Die Mischeinheit besteht aus zwei Spritzen mit motorbetriebenen und computergesteuerten Stempeln. Die Ausgänge der Spritzen sind durch einen hoch-effizienten Mischer miteinander verbunden. Der Mischer ist wiederum mit einer Küvette verbunden. Die zwei Reaktions-Lösungen in den Spritzen werden während eines „Stopped-Flow“-Experiments vermischt und in die Küvette geleitet. Ein Ventil am Ausgang der Küvette registriert den Fluss des Reaktions-Gemisches aus der Küvette heraus. Daraufhin wird das Ventil geschlossen und der Antrieb der Spritzen wird gestoppt. Der Fluss des Reaktions-Gemisches in der

Küvette kommt zum Erliegen und die Reaktion der beiden Lösungen kann detektiert werden.

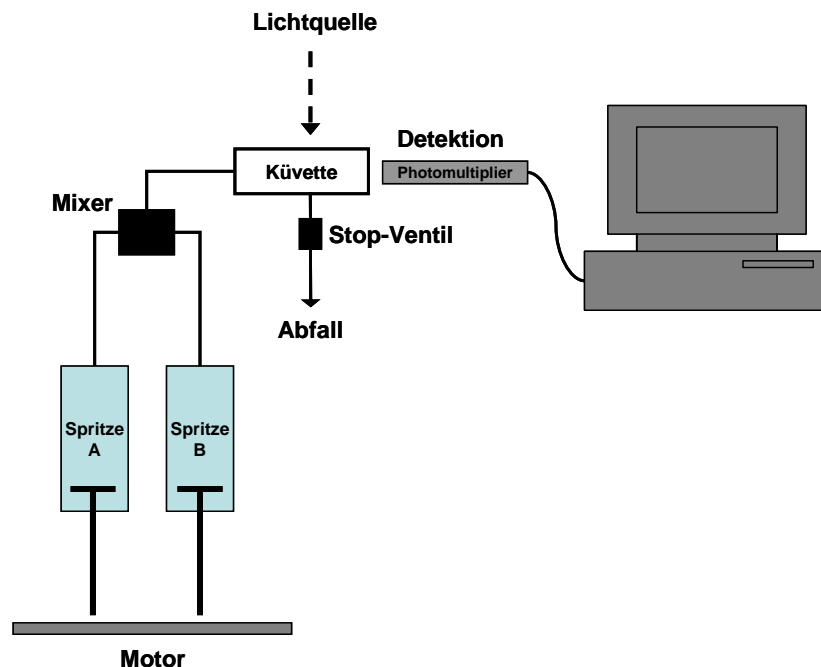


Abbildung IV-1 Schematische Darstellung der „Stopped-Flow“-Apparatur. Die Mischeinheit bestehend aus Spritze A und B ist durch einen Mixer mit der Detektionseinheit verbunden. In der Detektionseinheit wird die Reaktion in der Küvette durch die Veränderung der Intensität der Fluoreszenz oder des Streulichtes durch einen Photomultiplier wahrgenommen. Der Photomultiplier ist mit einem Computer verbunden, wodurch die Änderungen in der Streulicht- bzw. Fluoreszenz-Intensität aufgezeichnet werden können.

Von einer Lichtquelle wird Licht einer bestimmten Wellenlänge in die Küvette geleitet und kann dort die Reaktion, z.B. durch Anregen eines Fluoreszenzfarbstoffes, visualisieren. Die Lichtsignale werden von einem Photomultiplier aufgenommen und in elektronische Signale umgewandelt. Die elektronischen Signale können am angeschlossenen Computer aufgezeichnet werden.

Die hier beschriebene Apparatur wurde in der vorliegen Arbeit zur Aufzeichnung von Schwellungskinetiken von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten verwendet. Durch schnelles Mischen der Hefeprotoplasten mit einer hypoosmolaren Lösung wurde ein Schwellen der Protoplasten induziert. Das einfallende Licht streut an der Oberfläche der Protoplasten. Durch die Vergrößerung der Oberfläche der Protoplasten nimmt die Intensität des Streulichtes in einem Winkel von 180° zum einfallenden Licht zu, und im 90° Winkel ab. Durch die Messung im 90° Winkel wird demnach eine Abnahme der Streulicht-Intensität von dem Photomultiplier detektiert. Der Zeitliche Verlauf der

Abnahme der Streulicht-Intensität wird von einem mit dem Photomultiplier verbundenen Computer mit der Software Biokine aufgezeichnet.

4.7.2 Aufnahme von Schwellungskinetiken von *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten

Die Hefezellen wurden vor Beginn der Messungen protoplastiert. Durch die Protoplastierung stellt die rigide Zellwand der Hefen keine Barriere für die Ausdehnung der Plasmamembran dar. Im Anschluss an die Aufspaltung der Zellwand wurden die Zellen in SF-Puffer1 bzw. SF-Puffer2 resuspendiert ($OD_{600} \sim 2$). Die Zellsuspension wurde in die Spritze 3 der Mischeinheit gefüllt. Die Spritze 2 wurde mit M-Puffer1 bzw. M-Puffer2 befüllt. Die weiteren Einstellungen an der „Stopped-Flow“-Apparatur waren:

Licht	436nm
Temperatur	10°C
Aufnahmeraten	100µs 5000 Datenpunkte 2ms 2000 Datenpunkte 20ms 1000 Datenpunkte
Filter	300µs

Durch die Mischung der Hefe-Protoplasten mit den Misch-Puffern, wurde ein osmotischer Gradient über die Plasmamembran der Hefezellen von 300mOsmol angelegt. Wasser wurde entlang des Gradienten in die Zellen geleitet und führte zu einem Anschwellen der Protoplasten. Die Leitfähigkeit der Plasmamembran für H_2O bestimmt nun wie schnell Wasser in die Protoplasten geleitet wird. Mit der Kinetik des Schwellens konnte im Anschluss der osmotische Permeabilitätskoeffizient der Plasmamembran berechnet werden.

4.7.3 Berechnung des osmotischen Permeabilitätskoeffizienten (P_f) der Plasmamembran von *S.cerevisiae*-Protoplasten

Der osmotische Permeabilitätskoeffizient P_f dient als Maß für die Transportgeschwindigkeit [cm/s] von Wassermolekülen über eine Membran.

Zur Bestimmung des P_f der Plasmamembran der *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten wurden die Schwellungskinetiken der Protoplasten einer oder mehreren

Exponentialfunktionen angeglichen. Dazu wurde aus 10 Kinetiken einer Protoplastenpräparation mit Hilfe der Software Biokine eine Durchschnitts-Kinetik berechnet. Für die Durchschnitts-Kinetik wurde anschließend die Ratenkonstante k bestimmt. Hierzu wurde die Kinetik einer oder mehrere Exponentialfunktionen mit dem Algorithmus „simplex“ der Biokine Software angeglichen. Die angegliche Exponentialfunktion hatte die Gleichung:

$$Y = at + b + \sum_{i=1}^N c_i e^{-k_i t}$$

Mit Hilfe der Ratenkonstante (k) der angeglichenen Exponentialfunktion, dem molaren Volumen von H_2O (V_w), dem Volumen (V_0) und Oberfläche (S_0) der Protoplasten und der Konzentration der osmotisch wirksamen Teilchen im Außenmedium (C_{out}) der Protoplasten zu Beginn der Messungen, konnte der osmotische Permeabilitätskoeffizient P_f mit folgender Formel berechnet werden:

$$P_f = k \times \frac{V_0}{S_0 \times V_w \times C_{out}} \quad (\text{van Heeswijk and van Os, 1986})$$

4.8 Gesamtprotein-Präparation von *S.cerevisiae*

Von einer Hefe Über-Nacht-Kultur wurden 1,5ml in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß bei 500xg für 3min in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Die Zellen wurden anschließend mit 500µl H_2O bidest gewaschen und in 100µl 1xProtein-Proben-Puffer aufgenommen. Nach 5min Inkubation bei 95°C wurde die Suspension für 5s bei 14000rpm zentrifugiert und 10µl des Überstandes anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

4xProtein-Proben-Puffer	250mM	Tris/HCl pH6,8
	200mM	DTT
	8%	SDS
	40%	Glycerin
	0,01%	Bromphenolblau

4.9 Präparation von Membranproteinen von *S.cerevisiae*

Zur Präparation von Membranproteinen wurden 25ml einer Hefe-Kultur bei 500xg für 3min zentrifugiert und mit H_2O bidest gewaschen. Die Zellen wurden in

3ml/g Hefezellen in Homogenisierungspuffer resuspendiert und 3g säuregewaschene Glaskugeln (\varnothing 0,3mm) zugegeben. Zum Aufbrechen der Hefezellen wurde die Suspension für 2min gemischt und anschließend für 2min auf Eis inkubiert. Der Misch-/Kühlungs-Zyklus wurde 4mal wiederholt um einen vollständigen Aufschluss der Hefezellen zu erreichen. Der Überstand wurde von den Glaskugeln abgenommen und die Glaskugeln mit dem gleichen Volumen Homogenisierungspuffer 2x gewaschen. Hierzu wurde der Puffer auf die Glaskugeln gegeben, kurz gemischt und die Flüssigkeit wieder abgenommen. Die Überstände des Aufschlusses und der Waschschrte wurden vereinigt und für 5min bei 2500xg und 4°C zentrifugiert. Hierbei wurden die intakten Hefezellen und Zellwandfragmente sedimentiert. Zur Sedimentation der Membranen wurde der Überstand anschließend für 15min bei 50000rpm (Ultrazentrifuge) und 15°C zentrifugiert. Das Membranpellet wurde nach der Zentrifugation in TB-Puffer resuspendiert und die Proteinkonzentration der Suspension bestimmt.

Homogenisierungspuffer	50mM 1mM 5% 1µg/ml 1µg/ml	NaPO ₄ pH7,5 EDTA Glycerin Leupeptin Pepstatin
TB-Puffer	10mM 1mM	Tris/HCl pH 7,5 DTT

4.10 Bestimmung des zytosolischen pH von *S.cerevisiae* unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Bisacetat

Fluorescein und viele seiner Derivate weisen viele pH-abhängige ionische Gleichgewichtszustände auf (Abbildung IV-2).

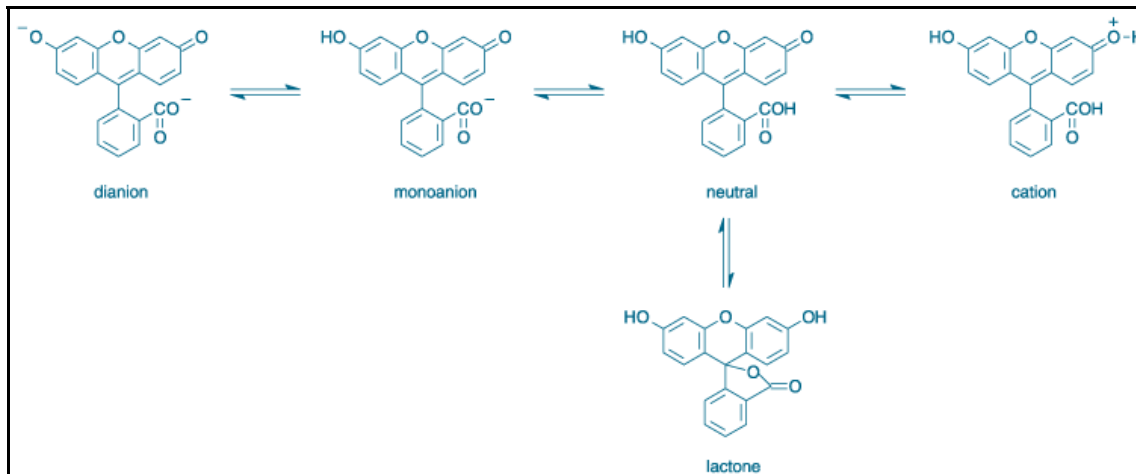


Abbildung IV-2 Ionisierungsgleichgewichte von Fluorescein (www.invitrogen.com)

Bei pH 9 liegen sowohl die phenolische, als auch die Carboxyl-Gruppe der Verbindung ionisiert vor. Bei Erniedrigung des pH-Wertes wird zuerst die phenolische Gruppe protoniert ($pK_a \sim 6,4$). Dies führt zur Verschiebung des Gleichgewichtes zur monoanionischen Form des Fluorescein. Durch die zusätzliche Protonierung der Carboxyl-Gruppe ($pK_a < 5$) erhält die Verbindung eine neutrale Ladung. Bei weiterer Ansäuerung wird ein Fluorescein-Kation ($pK_a \sim 2,1$) erzeugt.

Einzig die di- und monoanionische Form des Fluorescein zeigen fluoreszierende Eigenschaften. Daher zeigt das Absorptions-Spektrum von Fluorescein deutlich eine pH-abhängige Abnahme der Absorption (Abbildung IV-3A). Das Emissions-Spektrum weist einen nahezu identischen Verlauf bei den Messungen bei den verschiedenen pH-Werten auf (Abbildung IV-3B). Jedoch ist auch hier die deutliche Abnahme der Fluoreszenz-Intensität bei saurem pH-Wert zu beobachten.

Für die Messungen des zytosolischen pH-Wertes von *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen wurde das farblose membranpermeable Fluorescein-Bisacetat verwendet. Durch intrazelluläre Hydrolasen wurden die Acetat-Gruppen abgespalten unter der Bildung des impermeablen fluoreszierenden Fluoresceins.

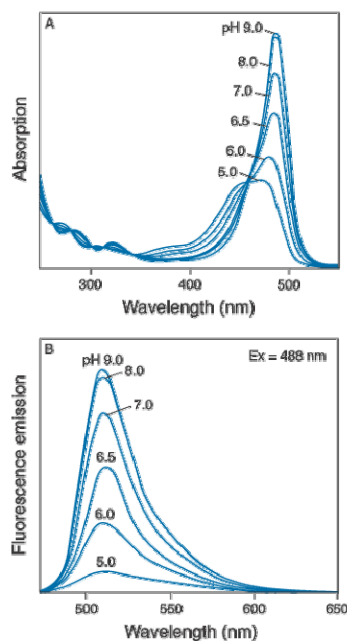


Abbildung IV-3 Absorptions- (A) und Emissions (B)-Spektrum von Fluorescein bei verschiedenen pH-Werten (www.invitrogen.com)

4.10.1 Kalibrierung des pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein

Zur Kalibrierung der pH-abhängigen Fluoreszenz von Fluorescein wurden McIlvain-Puffer-Lösungen mit pH-Werten von 5 bis 9 hergestellt. In den McIlvain-Puffern wurde anschließend Fluorescein bis zu einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ zugegeben. In einem Spektrofluorimeter (Perkin Elmer LS50B) wurden von jedem Ansatz Emissions-Spektren bei der Wellenlänge 520nm, nach der Anregung mit Licht der Wellenlängen von 400nm bis 500nm, aufgenommen. Zur Eichung der Fluoreszenz-Intensität wurde der Quotienten der Fluoreszenz-Intensitäten nach Anregung von Licht der Wellenlänge 490nm (Fluoreszenz-abhängige Wellenlänge) und 435nm (Fluoreszenz-unabhängige Wellenlänge) logarithmisch gegen den pH-Wert aufgetragen. Dem Verlauf der Werte der Quotienten wurde anschließend eine exponentielle Funktion angeglichen. Durch Messen der Fluoreszenz-Intensität bei 520nm nach der Anregung mit Licht der Wellenlängen 490nm und 435nm und Berechnung des Logarithmus des Quotienten der Intensitäten bei den beiden Wellenlängen, konnte durch Einsetzen in die exponentielle Funktion der pH-Wert einer Fluorescein-Lösung berechnet werden.

McIlvaine-Puffer	0,2M Di-Natrium-Hydrogenphosphat 0,1M Zitronensäure
	Der pH-Wert des Puffers wird durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der beiden Lösungen eingestellt

4.10.2 Bestimmung des zytosolischen pH-Wertes von *S.cerevisiae*

Im Anschluss an das Protoplastieren wurden die *S.cerevisiae*-Zellen in L-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von Fluorescein-Bisacetat bis zu einer Endkonzentration von 50µM wurden die Protoplasten bei 30°C für 15min und 250rpm inkubiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und in SF-PufferI bzw. SF-PufferII aufgenommen. Die Proben wurden anschließend im Spektrofluorimeter vermessen. Nach Messung der Fluoreszenz-Intensität bei 520nm nach Anregung mit Licht der Wellenlängen von 400nm bis 500nm wurde der Logarithmus des Quotient der Intensitäten bei 435nm und 490nm in die Funktion der Eichreihe eingesetzt und der pH-Wert berechnet.

Zur Messung des zytosolischen pH-Wertes nach Zugabe von 50mM Natriumacetat bei pH5 wurden die Protoplasten nach dem Beladen mit Fluorescein-Bisacetat in SF-PufferII resuspendiert. Nach der Zugabe von 50mM Natriumacetat wurde sofort mit der Aufnahme der Fluoreszenz-Intensität bei 520nm nach Anregung mit Licht der Wellenlängen 490nm und 435nm begonnen. Nach 8 min stellte sich ein Minimalwert bei der Messung der Fluoreszenz-Intensität bei 490nm ein. An diesem Punkt wurde der Quotient 490nm/435nm bestimmt und der pH-Wert mit Hilfe der Funktion der Kalibrierung bestimmt.

L-Puffer	1,6M Sorbitol 50mM Hepes/NaOH pH 7 5mM Deoxy-Glukose
Fluorescein-Stammlsg.	50mM Fluorescein-Bisacetat (gelöst in DMSO)

5 Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

5.1 Methoden zur Bearbeitung von DNA

5.1.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Zur Manipulationen der DNA, z.B. für den Einbau verschiedener Gene in Plasmide, war es notwendig, die DNA mittels spezifischer Restriktionsenzyme zu spalten. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Empfehlungen der Hersteller (Gibco BRL, MBI Fermentas) gewählt. In einem Reaktionsansatz wurden pro μg DNA 2 Einheiten (U) Enzym eingesetzt, um einen vollständigen Abbau der DNA zu gewährleisten. Die Reaktion wurde für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert. Das Ergebnis der Spaltung wurde durch Elektrophorese überprüft.

5.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte in Agarosegelen (ICN) unterschiedlicher Konzentration. Für Standardgele betrug diese 1%. Als Puffersystem diente 1xTAE. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 5-10V/cm durchgeführt. Zum Vergleich der Molekülgrößen wurde parallel ein Standard mit Fragmenten definierter Größe (HyperladderI, Bionline) aufgetrennt. Der Nachweis der DNA war durch die Fluoreszenz des im Gel enthaltenen DNA-interkalierenden Ethidiumbromids ($0,05 \mu\text{g/ml}$) unter UV-Licht möglich (ImageMaster, Pharmacia Biotech).

50 x TAE	242g	Tris, pH 8
	57,1ml	Essigsäure
	0,5M	EDTA pH8

5.1.3 Elution von DNA aus einem Agarosegel

Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid wurde DNA im Agarosegel im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und mit der umgebenen Agarose ausgeschnitten. Der Agaroseblock wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA unter Verwendung des Gel Extraktion System (QIAGEN, Hilden) isoliert. Die Effizienz der Isolation wurde durch Auftrennung eines Anteils der DNA überprüft.

5.2 Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR)

Durch den Einsatz sequenzspezifischer Primer lassen sich DNA-Fragmente mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vermehren. Die Komponenten für eine PCR-Reaktion wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß im Eisbad vermischt.

Standardansatz (25 µl)	1-10 ng	DNA-Matrize
	1 x	Reaktionspuffer (Biotherm)
	2 mM	dNTP-Mix (10 mM)
	0,4 pmol	Sense-Primer (10 pmol/µl)
	0,4 pmol	Antisense-Primer (10 pmol/µl)
	1,5 mM	MgCl ₂
	0,25 u	Taq-Polymersase (Biotherm, 5u/µl)
	X µl	bidest. H ₂ O (autokl.)

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Biotherm) durchgeführt. Die optimale Temperatur, bei der die Primer mit DNA-Matrize hybridisieren wurde über eine PCR mit einem Gradienten der Anlagerungs-Temperatur bestimmt.

5.3 Fusion von DNA Fragmenten durch „Splicing by overlap extension“ (SOE)-PCR

Durch das Verfahren der SOE-PCR können zwei DNA Fragmente ohne Restriktion und Ligation an definierten Stellen miteinander fusioniert werden (Grandori *et al.*, 1997; Warrens *et al.*, 1997). Das allgemeine Prinzip der Fusion von zwei DNA-Fragmenten A und B ist in Abbildung IV-4 schematisch dargestellt. Beide DNA-Fragmente werden jeweils in einer modifizierenden PCR unter Standardbedingungen mit überhängenden Primern, die an der Fusionsstelle komplementär sind, synthetisiert. Nach Aufreinigung der beiden modifizierten Fragmente werden sie zu gleichen Anteilen in einer dritten Standard-PCR als Matrize verwendet. Im Anlagerungsschritt der PCR hybridisieren die homologen Bereiche der Fragmente. Durch die gleichzeitige Anlagerung von

sequenzspezifischen Primern wird das Fusionsfragment durch die Polymerase im Verlängerungs-Schritt der PCR vervollständigt. In den weiteren Zyklen der PCR dient das Fusionsfragment als Vorlage.

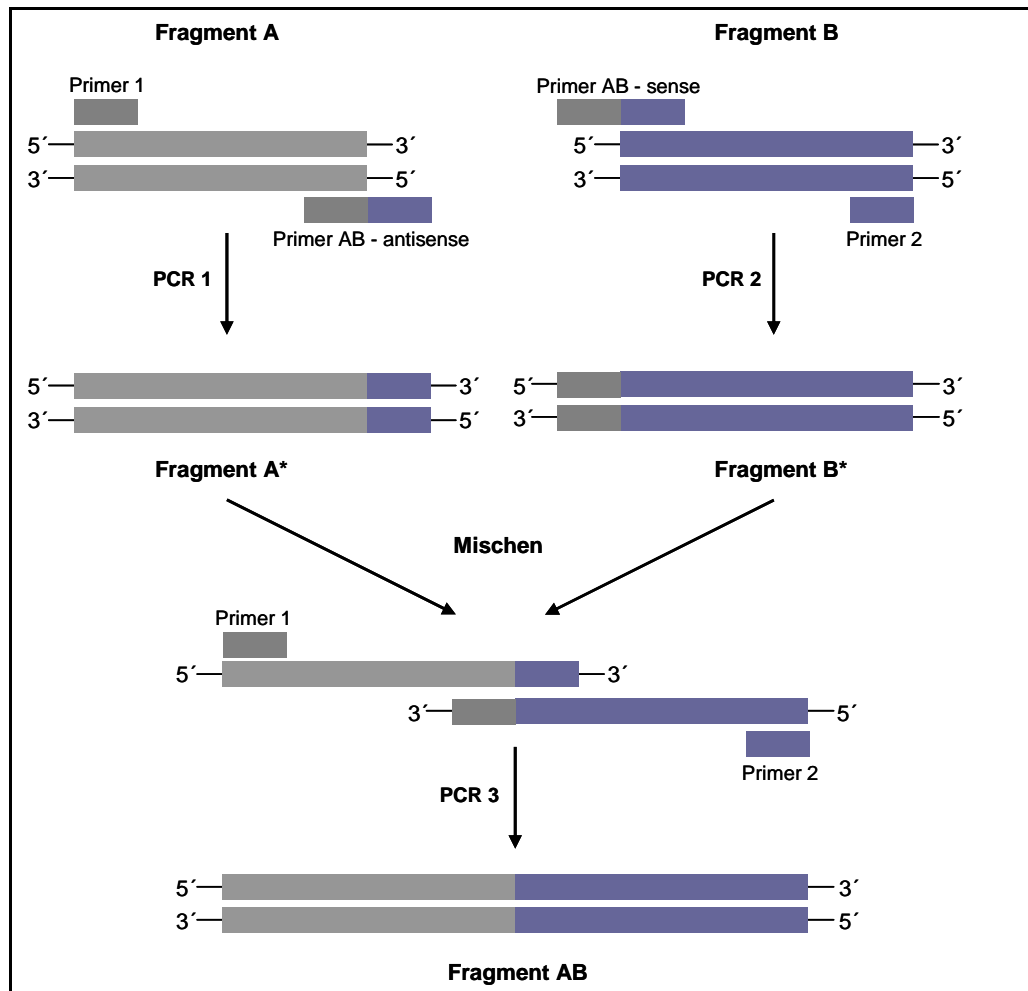


Abbildung IV-4 Allgemeines Prinzip der „Splicing by overlap extension“ (SOE)-PCR zur Fusionierung von zwei DNA-Fragmenten. Die Fragmente A und B werden in getrennten PCR-Reaktionen mit überhängenden Primern gezielt so modifiziert, dass sie im Bereich der Fusionsstelle komplementär zueinander sind. In der eigentlichen SOE-Reaktion hybridisieren die so modifizierten Fragmente und durch die flankierenden Primern kommt es (wie bei einer konventionellen PCR) zur Vervielfältigung des chimären Fragments AB.

5.4 Klonierung von DNA

5.4.1 T/A-Klonierung von PCR Produkten

Der Vektor pDrive (Qiagen) und pCR2.1 (Invitrogen) wurden speziell zur Subklonierung von *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierten DNA-Fragmenten konstruiert. Die *Taq*-DNA-Polymerase besitzt eine matrizenunabhängige terminale

Transferaseaktivität mit einer hohen Präferenz für dATP. Dadurch besitzen die 3'-Enden der PCR-Produkte ein überhängendes Adenin. Der linearisierte vorliegende Vektor pDrive/pCR2.1 weist ein überhängendes dTTP auf, womit die Effizienz der Ligation von PCR-Produkten deutlich erhöht (Abbildung IV-5). Zur Klonierung von PCR-Produkten in den pDrive/pCR2.1 Vektor wurde wie im beiliegenden Protokoll zum „PCR Cloning Kit“ (pDrive/Qiagen) und „TA Cloning Kit“ (pCR2.1/Invitrogen) verfahren.

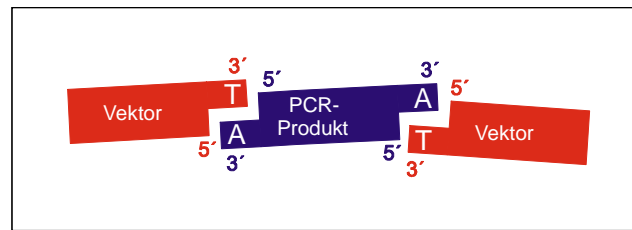


Abbildung IV-5 Schematische Darstellung der T/A-Klonierung. Das PCR-Produkt mit dATP-Überhängen wird in die Polylinker-Region mit dTTP-Überhängen ligiert.

5.4.2 Klonierung von PCR Produkten mit dem Gateway®-System

Das Prinzip der Klonierung von PCR Produkten mit dem Gateway® System (Integrase und Excisionase aus dem Bakteriophagen λ und den *Integration Host Factor* aus *E.coli*) beruht auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des Phagen λ , der mit Hilfe von Rekombinationsenzymen seine DNA in das Genom von *E.coli* integriert.

In einer PCR-Reaktion wird das zu klonierende cDNA-Fragment mit den Erkennungssequenzen (attB-Sequenzen) für die Integrase fusioniert (Abbildung IV-6A). In der folgenden homologen Rekombination zwischen den attB- und den attP-Sequenzen des Donor-Vektors wird das PCR-Produkt in den Donor-Vektor integriert (Abbildung IV-6B). Der Donor-Vektor mit integriertem PCR-Produkt wird im Folgenden als „Eingangs-Vektor“ bezeichnet und trägt, in Folge der homologen Rekombination, die Erkennungssequenzen (attL) der Excisionase. Als negativen Selektionsmarker trägt der Donor-Vektor zwischen den Erkennungssequenzen der Integrase ein „Killer-Gen“ (ccdB-Gen). Das ccdB-Gen codiert für einen Inhibitor der bakteriellen DNA-Gyrase. Durch die Expression des Inhibitors wird die DNA-Replikation unterbrochen und die Bakterien sterben ab (Bernard and Couturier, 1992; Miki *et al.*, 1992). Durch die Rekombination wird das ccdB-Gen durch das PCR-Produkt ersetzt.

Der Eingangs-Vektor dient als Ausgangspunkt für die Klonierung des PCR-Produktes in Plasmide (Ziel-Vektoren) für die Expression in verschiedenen Organismen. In einer Zweiten Rekombinationsreaktion (Abbildung IV-6C) zwischen den attL-Sequenzen des Eingangs-Vektors und den attR-Sequenzen des Ziel-Vektors wird das DNA-Fragment durch die Excisionase in den Ziel-Vektor integriert. Die Selektion erfolgt anschließend durch die unterschiedlichen Antibiotiker-Resistenzen der Eingangs- und Ziel-Vektoren und durch den Austausch des ccdB-Gens mit dem PCR-Produkt.

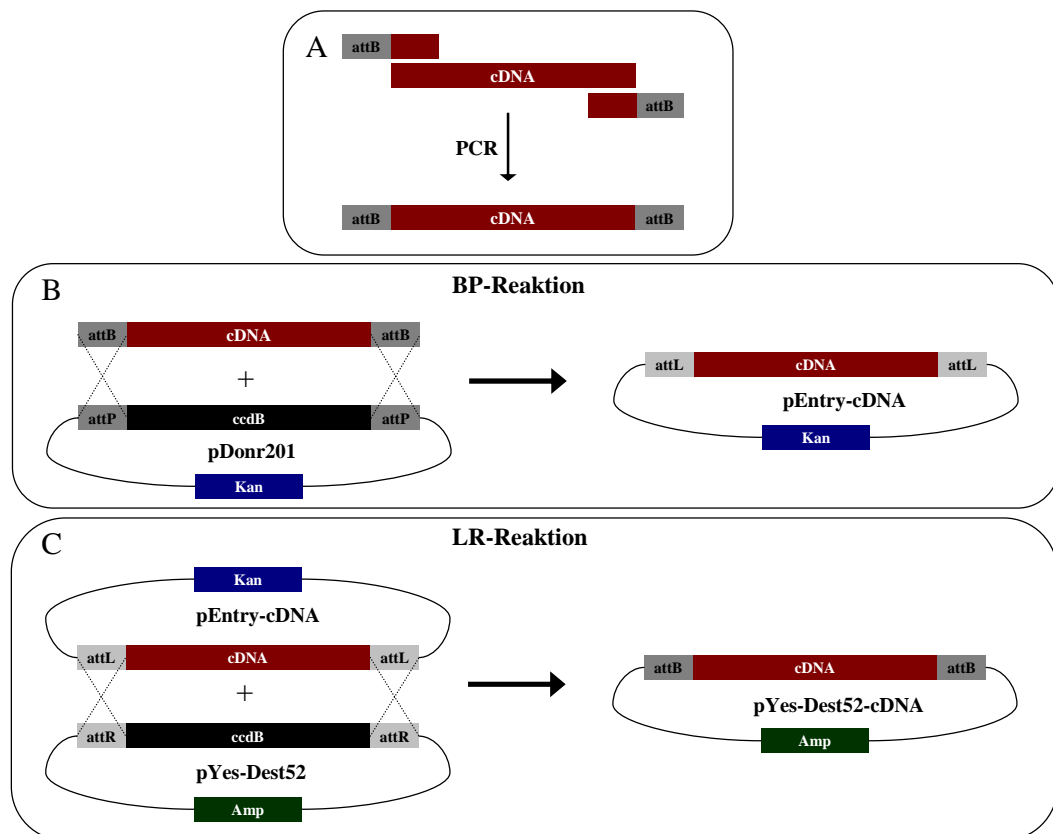


Abbildung IV-6 Prinzip der Klonierung von PCR-Produkten mit dem Gateway®-System. (A) Die cDNA wird mit den Erkennungssequenzen der Rekombinationsenzyme während einer PCR mit überhängenden Primer fusioniert. (B) Herstellung des Eingangs-Vektors. Durch die Rekombinationsreaktion des PCR Produktes mit einem Donor-Vektor an homologen Erkennungssequenzen (attB-attP) wird das PCR-Produkt in den Donor-Vektor kloniert. (C) Herstellung des Ziel-Vektors. Durch die homologe Rekombination an den Erkennungssequenzen der Klonase-Enzyme wird die cDNA des Entry-Vektors in den Destinations-Vektor kloniert.

5.4.2.1 Generierung von cDNA mit flankierenden attB-Erkennungssequenzen

Mit Hilfe der PCR wurden die cDNA der Aquaporine NtAQP1 und NtPIP2;1 mit den spezifischen Sequenzen attB1 und attB2 für die weitere Verwendung mit dem Gateway® System erzeugt. Mit der Software VectorNTI™ wurden Oligonukleotid-Sequenzen für die PCR Reaktion konstruiert, die genspezifische Sequenzen und die Erkennungssequenzen (attB) für die Integrase enthielten.

Tabelle 13 Primer für die Fusion einer cDNA mit Erkennungssequenzen (gelb) für das Gateway® System

attB-sense-Primer 5'-3'
GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACC-genspezifische-Sequenz
attB-antisense-Primer 5'-3'
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT-genspezifische-Sequenz

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Einleitende Denaturierung	95°C	5min	1
Denaturierung	95°C	30s	25
Primer-Anlagerung	58-62°C	30s	
Primer-Verlängerung	72°C	60s	
Abschließende Primer-Verlängerung	72°C	5min	1

Im Anschluss an die PCR wurde das PCR Produkt über ein Agarosegel gereinigt und für die BP-Reaktion verwendet.

5.4.2.2 Klonierung des PCR-Produktes in den Hefeexpressionsvektor pYesDest52 mit Hilfe des Gateway®-Systems

Das PCR-Produkt wurde während der BP-Reaktion in den pDonr201-Vektor integriert. In der folgenden LR-Reaktion wurde die cDNA der Aquaporine in den Hefe-Expressionsvektor pYesDest52 kloniert. Die Reaktions-Ansätze wurden wie im Begleitheft des Gateway-Cloning-Kit (Invitrogen) vorbereitet und zur Integration des PCR-Produktes wurde wie beschrieben verfahren

5.4.3 Ligation von DNA

Das molare Verhältnis zwischen Plasmid-DNA und einem DNA-Fragment beeinflusst die Effizienz einer Ligrationsreaktion. Für eine optimale Ligation wurde ein Verhältnis von Fragment- zu Plasmid-DNA von 5:1 empfohlen. Die Stoffmenge (pmol) eines DNA-Moleküls kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$DNA[pmol] = \frac{2 \times 10^{-6} \times DNA[\mu g]}{DNA[bp] \times 660 Da}$$

Ligationsreaktion (20µl)	100ng	linearisierte Plasmid-DNA
	x ng	DNA-Fragment
	2µl	10x T4 Ligase-Puffer
	1u	T4 DNA Ligase
	x µl	dH ₂ O

Das Reaktionsgemisch wurde sorgfältig gemischt und für 5s zentrifugiert. Der Ansatz wurde dann für 1h bei 22°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurden 5µl des Ansatzes für die Transformation von *E. coli* weiterverwendet.

5.5 Gerichtete Mutagenese von DNA Sequenzen

Zur gerichteten Mutagenese von DNA Sequenzen wurde das QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit der Fa. Stratagene verwendet. Es wurde nach dem im Begleitheft beschriebenen Protokoll verfahren. Im Unterschied zum Beschriebenen wurden die Mengen in den Ansätzen halbiert.

5.6 Sequenzieren von DNA Fragmenten

Mit der Sequenzierung von DNA Fragmenten wurde die Fa. Seqlab beauftragt. Im Anschluss an eine Plasmid-DNA Präparation aus *E.coli* wurde die Reinheit der DNA durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel überprüft und die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt. Die Ansätze zur Sequenzierung wurden wie in der Vorlage zum Produkt „extended Hot Shot-Sequenzierung“ beschrieben zusammen gefügt und an die Fa. Seqlab gesendet.

6 Verfahren mit Proteinen

6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird zur Trennung von Proteingemischen eingesetzt. SDS ist ein anionisches Detergenz und überdeckt durch die Anlagerung an Proteine deren Eigenladung so effektiv, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (1,4g SDS pro 1g Protein).

Polyacrylamidgele bestehen aus Acrylamid, Bisacrylamid, N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS). Durch die Polymerisierung von Acrylamid entstehen lineare Acrylamid-Polymere. Erst mit der Vernetzung der Acrylamid-Polymere mit Bisacrylamid entsteht eine dreidimensionale Gelmatrix. APS dient als Katalysator für die Polymerisation von Acrylamid. APS bildet im Wasser freie Radikale, die mit Acrylamid reagieren. Das entstandene Acrylamid-Radikal kann mit einem weiteren Acrylamidmolekül (Monomer oder Polymer) weiterreagieren. TEMED wirkt als Katalysator der Polymerisation, indem es die Radikalbildung des APS erleichtert und dabei selbst ein stabiles Radikal darstellt.

Die Elektrophorese erfolgt in einem von U.K. Laemmli (Laemmli, 1970) eingeführten diskontinuierlichen Tris/HCl-Tris/Glycin-Puffersystem. Ein weitporiges Sammelgel überschichtet ein engmaschiges Trenngel. Durch die Ausbildung eines Feldstärkegradienten im Sammelgel erfolgt zu Beginn der Elektrophorese eine Aufkonzentrierung verschiedener Proteinklassen. Beim Auftreffen auf das Trenngel erfahren die Proteine einen hohen Reibungswiderstand, was zur weiteren Zonenschärfung führt. Im Trenngel wirkt nun auf alle Proteine die gleiche Feldstärke, sodass ausschließlich die Größe für die Wandergeschwindigkeit ausschlaggebend ist.

Die Gele wurden in einem „Gel Casting System“ (Biometra) angefertigt. Durchgeführt wurde die Elektrophorese in einer Elektrophorese-Kammer der Fa. Hoefer (Mighty Small II SE 250), in die wahlweise ein oder zwei Gele eingespannt werden konnten. Die Elektrophorese wurde bei einem Stromfluss von 30 mA/Gel durchgeführt. Sobald die Front des Markierungsfarbstoff Bromphenolblau des Gel-Ladungs-Puffers aus dem Gel ausgetreten war, wurde die Auftrennung beendet.

Sammelgel (4%)	4% 125mM 0,2% 0,1% 0,6%	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) Tris/HCl pH6,8 SDS TEMED APS
Trenngel (12,5%)	12,5% 375mM 0,2% 0,05% 0,33%	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) Tris/HCl pH8,8 SDS TEMED APS
Laufpuffer	129mM 0,1% 25mM	Glycin SDS Tris pH 8,3
4xProbenpuffer	250mM 200mM 8% 40% 0,01%	Tris/HCl pH6,8 DTT SDS Glycerin Bromphenolblau

6.2 Coomassie-Färbung von Proteinen

Zur Anfärbung der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung (Sambrook and Gething, 1989) überschichtet und für 1h auf einem Wankelschüttler bei RT inkubiert.

Um die Proteine in dem Gel sichtbar zu machen, wurde 2-3x mit H₂O-bidest. gewaschen und für ca. 5min in der Mikrowelle bei 750W erhitzt. Um die restliche leicht blaue Färbung des Gels zu entfernen wurde es für ca. 1h bei RT in Entfärbelösung inkubiert.

Coomassie-Färbelösung	10% Essigsäure 7% Methanol 1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva Elektrophoresis)
Entfärbelösung	10% Essigsäure 7% Methanol

6.3 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen in wässrigen Lösungen wurde durch den Einsatz des Farbstoffes „Coomassie Brilliant Blue G-250“ (CBBG) bestimmt (Bradford, 1976). Der

Farbstoff bindet spezifisch an die Aminosäuren Arginin, Tryptophan, Tyrosin, Histidin, und Phenylalanin. An den Aminosäuren gebunden, liegt der Farbstoff in der anionischen Form vor und hat ein Absorptions-Maximum für Licht der Wellenlänge von 595nm. In freier Form liegt CBBG als Kation vor und hat ein Absorptions-Maximum bei 470nm.

Für die Protein-Konzentrationsbestimmung in wässrigen Lösungen wurde das Roti Nanoquant Kit (Roth) verwendet und nach der Vorschrift im Begleitheft vorgegangen.

6.4 „Western-Blot“-Analysen von Proteinen

6.4.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran

Nach der Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die aufgetrennten Proteine in einer Tank-Blot-Aparatur (BioRad) auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran BA 83 Cellulosenitrat, Schleicher und Schuell) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 80V für 2h. Während des Transfers betrug die Temperatur des Transferpuffers 10°C.

Transferpuffer	10mM	CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid) pH 8 (frische 5M NaOH-Lsg.)
	10%	Methanol

6.4.2 Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz

Nach dem Transfer der Proteine wurde zur Maskierung der unbesetzten Bindungsstellen die Membran für 30min in Blockierungslösung inkubiert. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation mit dem in Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper. Nach 3x Waschen der Membran für 10min mit Waschpuffer, schloss sich eine 30min Inkubation mit einem alkalischen Phosphatase-konjugierten sekundären Antikörper an. Danach wurde die Membran 3x mit Waschpuffer für 10min gewaschen und anschließend zweimal für 5min mit Assay-Puffer behandelt.

Für die Detektion wurde ein Chemilumineszenz-Kit (Western-Star™ System, Applied Biosystems) verwendet. Mit Hilfe dieses Systems erfolgte der Nachweis des Sekundären Antikörpers, der an die aquaporinspezifischen Antikörper auf der Membran

gebunden war. Die enzymatische Dephosphorylierung des Substrates CDP-Star® durch die alkalische Phosphatase des sekundären Antikörpers führt zur Bildung eines metastabilen Dioxetan Phenolat-Anions, welches zerfällt und in gepufferter Lösung Licht emittiert. Die Lichtsignale wurden in einer Chemilumineszenz Dokumentations-Apparatur (ChemiDoc XRS System, BioRad) mit einer sensitiven CCD-Kamera aufgenommen. Die Expositionszeiten lagen bei 2-5min.

10xPBS-Puffer (1l)	82.3 g 23.5 g 40 g	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl
Blockierungslösung	1x 0,5% 5%	PBS Tween20 Magermilch-Pulver
Wasch-Puffer	1x 0,5%	PBS Tween20
Assay-Puffer	20mM 1mM	Tris/HCl pH 9,8 MgCl ₂
Chemilumineszenz-Substrat (1ml)	20mM 1mM 0,25mM 1x	Tris/HCl pH 9,8 MgCl ₂ CDP-Star® Nitro-BlockII™ (20x)

V Zusammenfassung

Die Aquaporine NtAQP1 und NtPIP2;1 aus *Nicotiana tabacum* als Vertreter der PIP1- bzw. PIP2-Proteinfamilie zeigten bei identischen Aminosäure-Sequenzen innerhalb der Selektivitätsfilter der Pore in funktionellen Tests unterschiedliche Leitfähigkeitscharakteristiken. Während NtPIP2;1 eine hohe Wasserleitfähigkeit bedingte, erhöhte sich diese für Membranen die NtAQP1 enthielten fast nicht. Diese Arbeit sollte klären wodurch dieser so deutliche funktionelle Unterschied verursacht wird.

Hierzu wurden chimäre Proteine aus NtAQP1 und NtPIP2;1 generiert. Der Austausch des N-Terminus von NtAQP1 mit dem von NtPIP2;1 erhöhte die H₂O-Leitfähigkeit des chimären Proteins signifikant. Die entsprechenden Aminosäuren des N-Terminus von NtPIP2;1 sind somit Teil des Mechanismus, welcher zum Funktionsunterschied führt.

Zudem konnte erstmalig gezeigt werden, dass zur H₂O-Leitung von NtAQP1 die direkte Interaktion mit NtPIP2;1 notwendig ist indem das molare Verhältnis von NtAQP1 und NtPIP2;1 in einem Heterotetramer in Bezug zur Wasserleitfähigkeit der Membran gesetzt wurde. Dies ist eine weitere Erklärung für die offensichtlichen Unterschiede in der Funktion.

Neben Protein-Protein-Wechselwirkungen sollen posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Protonierung die Funktion von pflanzlichen PIP beeinflussen. Nach der Überprüfung der Wirkung von Modifikationen auf die Funktion von NtAQP1 und NtPIP2;1 konnte ein regulativer Einfluss von posttranslationaler Phosphorylierung auf die Funktion der beiden Aquaporine ausgeschlossen werden. Alleine die Protonierung modulierte, durch einen noch nicht beschriebenen Mechanismus, die H₂O-Leitfähigkeit von NtPIP2;1.

VI Literaturverzeichnis

- Agre, P., King, L.S., Yasui, M., Guggino, W.B., Ottersen, O.P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., and Nielsen, S.** (2002). Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* **542**, 3-16.
- Alleva, K., Niemietz, C.M., Sutka, M., Maurel, C., Parisi, M., Tyerman, S.D., and Amodeo, G.** (2006). Plasma membrane of *Beta vulgaris* storage root shows high water channel activity regulated by cytoplasmic pH and a dual range of calcium concentrations. *J Exp Bot* **57**, 609-621.
- Bernard, P., and Couturier, M.** (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**, 735-745.
- Bertl, A., and Kaldenhoff, R.** (2007). Function of a separate NH₃-pore in Aquaporin TIP 2;2 from wheat. *FEBS Lett* **submitted**.
- Bertl, A., Bihler, H., Reid, J.D., Kettner, C., and Slayman, C.L.** (1998). Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J Membr Biol* **162**, 67-80.
- Bezanilla, F.** (2005). The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. *Trends Biochem Sci* **30**, 166-168.
- Biela, A., Grote, K., Otto, B., Hoth, S., Hedrich, R., and Kaldenhoff, R.** (1999). The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J* **18**, 565-570.
- Bienert, G.P., Moller, A.L., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Moller, I.M., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P.** (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* **282**, 1183-1192.
- Bignell, G.R., and Evans, I.H.** (1996). Genomic yeast DNA clone banks. Construction and gene isolation. *Methods Mol Biol* **53**, 155-187.

- Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., Wood, J.L., Morgan, D.O., and Shokat, K.M.** (2000). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**, 395-401.
- Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A., and Agre, P.** (1999). Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem* **68**, 425-458.
- Bots, M., Feron, R., Uehlein, N., Weterings, K., Kaldenhoff, R., and Mariani, T.** (2005). PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *J Exp Bot* **56**, 113-121.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brown, D.** (2003). The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F893-901.
- Chaumont, F., Moshelion, M., and Daniels, M.J.** (2005). Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell* **97**, 749-764.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R., and Chrispeels, M.J.** (2000). Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol* **122**, 1025-1034.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M.J., and Jung, R.** (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol* **125**, 1206-1215.
- Citovsky, V., Lee, L.Y., Vyas, S., Glick, E., Chen, M.H., Vainstein, A., Gafni, Y., Gelvin, S.B., and Tzfira, T.** (2006). Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta. *J Mol Biol* **362**, 1120-1131.
- Cohen, P.** (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* **58**, 453-508.
- de Groot, B.L., and Grubmüller, H.** (2001). Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* **294**, 2353-2357.

-
- de Groot, B.L., Frigato, T., Helms, V., and Grubmuller, H.** (2003). The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *J Mol Biol* **333**, 279-293.
- Dean, R.M., Rivers, R.L., Zeidel, M.L., and Roberts, D.M.** (1999). Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry* **38**, 347-353.
- Denker, B.M., Smith, B.L., Kuhajda, F.P., and Agre, P.** (1988). Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem* **263**, 15634-15642.
- Ding, X., Iwasaki, I., and Kitagawa, Y.** (2004). Overexpression of a lily PIP1 gene in tobacco increased the osmotic water permeability of leaf cells. *Plant Cell and Environment* **27**, 177-186.
- Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M., and Chaumont, F.** (2004). Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell* **16**, 215-228.
- Fotiadis, D., Jeno, P., Mini, T., Wirtz, S., Muller, S.A., Frayssé, L., Kjellbom, P., and Engel, A.** (2001). Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. *J Biol Chem* **276**, 1707-1714.
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L.J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., and Stroud, R.M.** (2000). Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290**, 481-486.
- Fujiyoshi, Y., Mitsuoka, K., de Groot, B.L., Philippsen, A., Grubmuller, H., Agre, P., and Engel, A.** (2002). Structure and function of water channels. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 509-515.
- Gerbeau, P., Guclu, J., Ripoche, P., and Maurel, C.** (1999). Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J* **18**, 577-587.
- Gerbeau, P., Amodeo, G., Henzler, T., Santoni, V., Ripoche, P., and Maurel, C.** (2002). The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J* **30**, 71-81.

- Grandori, R., Struck, K., Giovanielli, K., and Carey, J.** (1997). A three-step PCR protocol for construction of chimeric proteins. *Protein Eng* **10**, 1099-1100.
- Guenther, J.F., Chanmanivone, N., Galetovic, M.P., Wallace, I.S., Cobb, J.A., and Roberts, D.M.** (2003). Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell* **15**, 981-991.
- Harvengt, P., Vlerick, A., Fuks, B., Wattiez, R., Ruyschaert, J.M., and Homble, F.** (2000). Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg(2+)-dependent and Ca(2+)-regulated kinase. *Biochem J* **352 Pt 1**, 183-190.
- Haworth, R.S., and Fliegel, L.** (1993). Intracellular pH in *Schizosaccharomyces pombe*--comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* **124**, 131-140.
- Haworth, R.S., Lemire, B.D., Crandall, D., Cragoe, E.J., Jr., and Fliegel, L.** (1991). Characterisation of proton fluxes across the cytoplasmic membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1098**, 79-89.
- Hevesy, G., Hofer, E., and Krogh, A.** (1935). The permeability of the skin of frogs to water as determined by D₂O and H₂O. *Skand. Arch. Physiol.* **72**, 199.
- Hille, B.** (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. (Sinauer Associates Inc.).
- Holm, L.M., Jahn, T.P., Moller, A.L., Schjoerring, J.K., Ferri, D., Klaerke, D.A., and Zeuthen, T.** (2005). NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* **450**, 415-428.
- Ishikawa, F., Suga, S., Uemura, T., Sato, M.H., and Maeshima, M.** (2005). Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **579**, 5814-5820.
- Jahn, T.P., Moller, A.L., Zeuthen, T., Holm, L.M., Klaerke, D.A., Mohsin, B., Kuhlbrandt, W., and Schjoerring, J.K.** (2004). Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett* **574**, 31-36.

- Javot, H., Lauvergeat, V., Santoni, V., Martin-Laurent, F., Guclu, J., Vinh, J., Heyes, J., Franck, K.I., Schaffner, A.R., Bouchez, D., and Maurel, C.** (2003). Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell* **15**, 509-522.
- Johanson, U., and Gustavsson, S.** (2002). A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Mol Biol Evol* **19**, 456-461.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjoval, S., Frayse, L., Weig, A.R., and Kjellbom, P.** (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* **126**, 1358-1369.
- Johansson, I., Larsson, C., Ek, B., and Kjellbom, P.** (1996). The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential. *Plant Cell* **8**, 1181-1191.
- Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V.K., Chrispeels, M.J., Larsson, C., and Kjellbom, P.** (1998). Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* **10**, 451-459.
- Johnson, K.D., and Chrispeels, M.J.** (1992). Tonoplast-Bound Protein Kinase Phosphorylates Tonoplast Intrinsic Protein. *Plant Physiol* **100**, 1787-1795.
- Jung, J.S., Bhat, R.V., Preston, G.M., Guggino, W.B., Baraban, J.M., and Agre, P.** (1994). Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 13052-13056.
- Kaldenhoff, R., and Fischer, M.** (2006). Functional aquaporin diversity in plants. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1134-1141.
- Kammerloher, W., Fischer, U., Piechottka, G.P., and Schaffner, A.R.** (1994). Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J* **6**, 187-199.

- Karlsson, M., Fotiadis, D., Sjovall, S., Johansson, I., Hedfalk, K., Engel, A., and Kjellbom, P.** (2003). Reconstitution of water channel function of an aquaporin overexpressed and purified from *Pichia pastoris*. *FEBS Lett* **537**, 68-72.
- Kase, H., Iwahashi, K., Nakanishi, S., Matsuda, Y., Yamada, K., Takahashi, M., Murakata, C., Sato, A., and Kaneko, M.** (1987). K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **142**, 436-440.
- Kerppola, T.K.** (2006). Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* **1**, 1278-1286.
- Klebl, F., Wolf, M., and Sauer, N.** (2003). A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (*Cucurbita pepo* L.), and by *Arabidopsis thaliana* delta-TIP or gamma-TIP. *FEBS Lett* **547**, 69-74.
- Kukulski, W., Schenk, A.D., Johanson, U., Braun, T., de Groot, B.L., Fotiadis, D., Kjellbom, P., and Engel, A.** (2005). The 5A structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1. *J Mol Biol* **350**, 611-616.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laize, V., Gobin, R., Rousselet, G., Badier, C., Hohmann, S., Ripoche, P., and Tacnet, F.** (1999). Molecular and functional study of AQY1 from *Saccharomyces cerevisiae*: role of the C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 139-144.
- Liu, L.H., Ludewig, U., Frommer, W.B., and von Wiren, N.** (2003). AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 790-800.
- Loque, D., Ludewig, U., Yuan, L., and von Wiren, N.** (2005). Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiol* **137**, 671-680.

-
- Ma, J.F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., and Yano, M.** (2006). A silicon transporter in rice. *Nature* **440**, 688-691.
- Maurel, C.** (2007). Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Lett* **581**, 2227-2236.
- Maurel, C., Kado, R.T., Guern, J., and Chrispeels, M.J.** (1995). Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP. *Embo J* **14**, 3028-3035.
- Miki, T., Park, J.A., Nagao, K., Murayama, N., and Horiuchi, T.** (1992). Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in *Escherichia coli*. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress *letD* (*ccdB*) product growth inhibition. *J Mol Biol* **225**, 39-52.
- Mizutani, M., Watanabe, S., Nakagawa, T., and Maeshima, M.** (2006). Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47**, 1420-1426.
- Moshelion, M., Becker, D., Biela, A., Uehlein, N., Hedrich, R., Otto, B., Levi, H., Moran, N., and Kaldenhoff, R.** (2002). Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *Plant Cell* **14**, 727-739.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A., and Fujiyoshi, Y.** (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**, 599-605.
- Nakamoto, R.K., Rao, R., and Slayman, C.W.** (1991). Expression of the yeast plasma membrane [H⁺]-ATPase in secretory vesicles. A new strategy for directed mutagenesis. *J Biol Chem* **266**, 7940-7949.
- Niemietz, C.M., and Tyerman, S.D.** (2000). Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett* **465**, 110-114.
- Otto, B., and Kaldenhoff, R.** (2000). Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta* **211**, 167-172.

- Park, J.H., and Saier, M.H., Jr.** (1996). Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol* **153**, 171-180.
- Polevoda, B., and Sherman, F.** (2003). N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Mol Biol* **325**, 595-622.
- Preston, G.M., and Agre, P.** (1991). Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11110-11114.
- Quigley, F., Rosenberg, J.M., Shachar-Hill, Y., and Bohnert, H.J.** (2002). From genome to function: the Arabidopsis aquaporins. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0001.
- Ringler, P., Borgnia, M.J., Stahlberg, H., Maloney, P.C., Agre, P., and Engel, A.** (1999). Structure of the water channel AqpZ from Escherichia coli revealed by electron crystallography. *J Mol Biol* **291**, 1181-1190.
- Rivers, R.L., Dean, R.M., Chandy, G., Hall, J.E., Roberts, D.M., and Zeidel, M.L.** (1997). Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes. *J Biol Chem* **272**, 16256-16261.
- Sambrook, J., and Gething, M.J.** (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**, 224-225.
- Sanford, J.C., Smith, F.D., and Russell, J.A.** (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol* **217**, 483-509.
- Santoni, V., Vinh, J., Pflieger, D., Sommerer, N., and Maurel, C.** (2003). A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots. *Biochem J* **373**, 289-296.
- Santoni, V., Verdoucq, L., Sommerer, N., Vinh, J., Pflieger, D., and Maurel, C.** (2006). Methylation of aquaporins in plant plasma membrane. *Biochem J* **400**, 189-197.
- Siefritz, F., Tyree, M.T., Lovisolo, C., Schubert, A., and Kaldenhoff, R.** (2002). PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* **14**, 869-876.

-
- Siefritz, F., Biela, A., Eckert, M., Otto, B., Uehlein, N., and Kaldenhoff, R.** (2001). The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1. *J Exp Bot* **52**, 1953-1957.
- Sjovall-Larsen, S., Alexandersson, E., Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., and Kjellbom, P.** (2006). Purification and characterization of two protein kinases acting on the aquaporin SoPIP2;1. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1157-1164.
- Slavik, J.** (1982). Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. *FEBS Lett* **140**, 22-26.
- Slavik, J.** (1983). Intracellular pH topography: determination by a fluorescent probe. *FEBS Lett* **156**, 227-230.
- Soveral, G., Veiga, A., Loureiro-Dias, M.C., Tanghe, A., Van Dijck, P., and Moura, T.F.** (2006). Water channels are important for osmotic adjustments of yeast cells at low temperature. *Microbiology* **152**, 1515-1521.
- Sui, H., Han, B.G., Lee, J.K., Walian, P., and Jap, B.K.** (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* **414**, 872-878.
- Sung, M.K., and Huh, W.K.** (2007). Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**, 767-775.
- Tajkhorshid, E., Nollert, P., Jensen, M.O., Miercke, L.J., O'Connell, J., Stroud, R.M., and Schulten, K.** (2002). Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science* **296**, 525-530.
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., von Wiren, N., and Fujiwara, T.** (2006). The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* **18**, 1498-1509.
- Temmei, Y., Uchida, S., Hoshino, D., Kanzawa, N., Kuwahara, M., Sasaki, S., and Tsuchiya, T.** (2005). Water channel activities of *Mimosa pudica* plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation. *FEBS Lett* **579**, 4417-4422.

- Thomas, D., Bron, P., Ranchy, G., Duchesne, L., Cavalier, A., Rolland, J.P., Raguene-Nicol, C., Hubert, J.F., Haase, W., and Delamarche, C.** (2002). Aquaglyceroporins, one channel for two molecules. *Biochim Biophys Acta* **1555**, 181-186.
- Tischler, A.S., Ruzicka, L.A., and Perlman, R.L.** (1990). Mimicry and inhibition of nerve growth factor effects: interactions of staurosporine, forskolin, and K252a in PC12 cells and normal rat chromaffin cells in vitro. *J Neurochem* **55**, 1159-1165.
- Tornroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R., and Kjellbom, P.** (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* **439**, 688-694.
- Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D.T., Bligny, R., and Maurel, C.** (2003). Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* **425**, 393-397.
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F., and Kaldenhoff, R.** (2003). The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* **425**, 734-737.
- van Heeswijk, M.P., and van Os, C.H.** (1986). Osmotic water permeabilities of brush border and basolateral membrane vesicles from rat renal cortex and small intestine. *J Membr Biol* **92**, 183-193.
- Veenhoff, L.M., Heuberger, E.H., and Poolman, B.** (2002). Quaternary structure and function of transport proteins. *Trends Biochem Sci* **27**, 242-249.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J., and Pantoja, O.** (2004). Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol* **135**, 2318-2329.
- Wallace, I.S., and Roberts, D.M.** (2004). Homology modeling of representative subfamilies of Arabidopsis major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiol* **135**, 1059-1068.
- Wallace, I.S., Choi, W.G., and Roberts, D.M.** (2006). The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1165-1175.

-
- Wallace, I.S., Wills, D.M., Guenther, J.F., and Roberts, D.M.** (2002). Functional selectivity for glycerol of the nodulin 26 subfamily of plant membrane intrinsic proteins. *FEBS Lett* **523**, 109-112.
- Warrens, A.N., Jones, M.D., and Lechler, R.I.** (1997). Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* **186**, 29-35.
- Weaver, C.D., Crombie, B., Stacey, G., and Roberts, D.M.** (1991). Calcium-Dependent Phosphorylation of Symbiosome Membrane Proteins from Nitrogen-Fixing Soybean Nodules : Evidence for Phosphorylation of Nodulin-26. *Plant Physiol* **95**, 222-227.
- Weig, A.R., and Jakob, C.** (2000). Functional identification of the glycerol permease activity of *Arabidopsis thaliana* NLM1 and NLM2 proteins by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **481**, 293-298.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K.** (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14 Suppl**, S165-183.
- Zelazny, E., Borst, J.W., Muylaert, M., Batoko, H., Hemminga, M.A., and Chaumont, F.** (2007). FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12359-12364.
- Zhao, Y., Boguslawski, G., Zitomer, R.S., and DePaoli-Roach, A.A.** (1997). *Saccharomyces cerevisiae* homologs of mammalian B and B' subunits of protein phosphatase 2A direct the enzyme to distinct cellular functions. *J Biol Chem* **272**, 8256-8262.

VII Anhang

1 Tabellarische P_f -Werte

Tabelle 14 P_f -Werte der *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten die *NtAQP1*, *NtPIP2;1* und das chimäre Protein *nP2A1* exprimierten ($n=30 \pm$ Standardfehler, mit *a* und *b* sind die Signifikanz-Gruppen bezeichnet)

	Ev	NtAQP1	NtPIP2;1	nP2A1
Pf [$\times 10^{-4}$ cm*s-1]	3,65 \pm 0,3a	4,56 \pm 0,81a	3390 \pm 91b	5,68 \pm 0,27b

Tabelle 15 P_f -Werte der Hefeprotoplasten die die künstlichen Tetramere aus *NtAQP1* und *NtPIP2;1* exprimierten ($n=30 \pm$ Standardfehler)

	Ev	3xNtAQP1- 1xNtPIP2;1	2xNtAQP1- 2xNtPIP2;1	4xNtPIP2;1
Pf [$\times 10^{-4}$ cm*s-1]	3,52 \pm 0,26	148 \pm 8,2	1690 \pm 70	1810 \pm 68

Tabelle 16 P_f -Werte [$\times 10^{-4}$ cm/s] für *NtPIP2;1* und *NtPIP2;1*-Mutanten exprimierender *Saccharomyces cerevisiae* Protoplasten ($n=30 \pm$ Standardfehler)

	Ev	NtPIP2;1	S118A	S277A	S118A/ S277A	H196A	H196A/ S277A
pHi 6.46	3,61 \pm 0,26	3390 \pm 56	3,65 \pm 0,18	5070 \pm 161	3,55 \pm 0,37	1550 \pm 35	2210 \pm 22
pHi 6.35	3,96 \pm 0,18	2500 \pm 85	3,85 \pm 0,27	2800 \pm 273	4,06 \pm 0,44	1560 \pm 55	2300 \pm 45
pHi 6.13	3,75 \pm 0,10	1590 \pm 52	3,96 \pm 0,47	1630 \pm 138	3,85 \pm 0,43	1610 \pm 27	2120 \pm 82

Tabelle 17 P_f -Werte [$\times 10^{-4}$ cm/s] für *NtAQP1* und die *NtAQP1*-Mutante exprimierender *Saccharomyces cerevisiae*-Protoplasten (\pm SE, $n=3$)

	Ev	NtAQP1	S129A
pHi 6.46	3,61 \pm 0,26	4,03 \pm 0,44	4,16 \pm 0,57
pHi 6.35	3,96 \pm 0,18	4,11 \pm 0,36	4,26 \pm 0,53
pHi6.13	3,75 \pm 0,10	3,88 \pm 0,47	4,06 \pm 0,27

2 Sequenzen

2.1 nP2A1-DNA-Sequenz

					NtAQP1
					NtPIP2;1
1	GGTACCATGT	CAAAGGACGT	GATTGAAGAA	GGACAAGTTC	ATCAACAGCA
51	CGGGAAGGAT	TACGTGGACC	CACCACCAGC	TCCTTTGCTT	GATTTTGCAG
101	AACCTCAAGCT	CTGGTCTTTT	CACAGAGCTC	TTATTGCAGA	ATTTATGGCT
151	ACTTTCTTGT	TTTTGTACAT	CACATCTTGT	ACTGTTATGG	GTCTTAAGAG
201	ATCTGATAGT	CTGTGTAGTT	CAGTTGGTAT	TCAAGGTGTT	GCTTGGGCTT
251	TTGGTGGTAT	GATCTTTGCT	TTGGTTTACT	GTAAGTCTGG	TATCTCAGGA
301	GGACACATCA	ACCCAGCTGT	GACCTTTGGA	TTGTTCTTGG	CAAGGAAACT
351	GTCTTAAC	AGGGCTATTT	TCTACATAGT	GATGCAATGC	CTTGGTGCAA
401	TTTGTGGTGC	TGGTGTGTG	AAGGGATTCA	TGGTTGGTCC	ATACCAGAGA
451	CTTGGTGGTG	GTGCTAATGT	TGTTAACCAT	GGTTACACCA	AAGGTGATGG
501	CCTTGGTGCT	GAAATTATTG	GCACTTTGT	CCTTGTTTAC	ACTGTTTTCT
551	CTGCTACTGA	TGCTAAGAGA	AATGCCAGAG	ACTCACATGT	TCCTATTTTG
601	GCACCACTTC	CCATCGGATT	CGCGGTTTTC	TTGGTTCATT	TGGCCACCAT
651	TCCCATCACC	GGAAGTGGCA	TCAACCCCGC	TAGGAGTCTT	GGAGCTGCGA
701	TCATCTACAA	CACAGACCAG	GCATGGGACG	ACCACTGGAT	CTTTTGGGTT
751	GGACCATCA	TTGGAGCTGC	ACTTGCTGCA	GTTTACCATC	AAATAATCAT
801	CAGAGCCATT	CCATTCCACA	AGTCGTCTCT	CGAG	

2.2 cA1P2-DNA-Sequenz

					NtAQP1
					NtPIP2;1
1	GGATCCATGG	CAGAAAACAA	AGAAGAAGAT	GTTAAGCTTG	GAGCTAACAA
51	ATTGAGAGAA	ACACAGCCAT	TAGGAACAGC	TGCTCAAACA	GACAAAGATT
101	ACAAAGAACC	ACCACAGCT	CCTTTGTTTG	AACCAGGGGA	ATTATCATCA
151	TGGTCATTTT	ACAGAGCTGG	AATTGCAGAA	TTTATGGCTA	CTTCTTTGTT
201	TTTGTACATC	ACTATCTTGA	CTGTTATGGG	TCTTAAGAGA	TCTGATAGTC
251	TGTGTAGTTC	AGTTGGTATT	CAAGGTGTTG	CTTGGGCTTT	TGGTGGTATG
301	ATCTTTGCTT	TGTTTACTG	TACTGCTGGT	ATCTCAGGAG	GACACATCAA
351	CCCAGCTGTG	ACCTTTGGAT	TGTCTTGGC	AAGGAAACTG	TCCTTAACCA
401	GGGCTATTTT	CTACATAGTG	ATGCAATGCC	TTGGTGCAAT	TTGTGGTGCT
451	GGTGTGTGTA	AGGGATTTCAT	GGTTGGTCCA	TACCAGAGAC	TTGGTGGTGG
501	TGCTGGTGCT	AATTTTGTGC	AACCTGGTTA	TAACAAGGGC	ACAGCTTTGG
551	GTGCTGAGAT	TATTGGAAC	TTTGTCTTGT	TTTACACTGT	TTTCTCTGCT
601	ACTGACCCCTA	AAAGAAGTGC	COGTGACTCC	CATGTCCCTG	TTTGGCCCC
651	TCTGCCAATT	GGTTTTGCTG	TTTTCATGGT	TCATTGGGCT	ACTATTCCTA
701	TTACTGGAAC	TGGTATTAAC	CCTGCTAGGA	GCTTTGGAGC	TGCTGTCAAT
751	TACAACACTG	AAAAAATCTG	GGATGATCAA	TGGATTTTCT	GGGTGGGACC
801	ATTTGTGGGA	GCATTGGTAG	CAGCAGTATA	TCATCAGTAT	ATCTTGAGAG
851	GTTTCAGCAAT	TAAGGCATTG	GGTTCCTTCC	GCAGTAACCC	AACCAACTAA
901	TCTAGA				

2.3 A1pP2-DNA-Sequenz

NtAQPI
NtPIP2;1

```

1      GGATCCATGG CAGAAAAACAA AGAAGAAGAT GTTAAGCTTG GAGCTAACAA
51     ATTCCAGAGAA ACACAGCCAT TAGGAACAGC TGCTCAAACA GACAAAGATT
101    ACAAAGAACC ACCACCAGCT CCTTTGTTTG AACCAGGGGA ATTATCATCA
151    TGGTCATTTT ACAGAGCTGG AATTGCAGAA TTTATGGCTA CTTTCTTGTT
201    TTTGTACATC ACTATCTTGA CTGTTATGGG TCTTAAGAGA TCTGATAGTC
251    TGTGTAGTTC AGTTGGTATT CAAGGTGTTG CTTGGGCTTT TGGTGGTATG
301    ATCTTTTGCTT TGGTTTACTG TACTGCTGGT ATCTACTGCA CTGCGCGTAT
351    CTCTGGTGGA CACATTAACC GACAGTGAC ATTTGGGTTG TCTCTAGCAA
401    GAAAAAGTGTC ATTGTTAAGA GCAATTTTCT ACATAGTGAT GCAATGCCTT
451    GGTGCAATTT GTGGTGCTGG TGTTGTGAAG GGATTCATGG TTGGTCCATA
501    CCAGAGACTT GGTGGTGGTG CTAATGTGTG TAACCATGGT TACACCAAAG
551    GTGATGGCCT TGGTGCTGAA ATTATTGGCA CTTTGTCCCT TGTTTACACT
601    GTTTTCTCTG CTACTGATGC TAAGAGAAAT GCCAGAGACT CACATGTTCC
651    TATTTTGCCA CCACTTCCCA TCGGATTCGC GGTTTTCTTG GTTCATTTGG
701    CCACCATTC CATCACCGGA ACTGTATTA ACCCTGCTAG GAGCTTTGGA
751    GCTGCTGTCA TTTACAACAC TGAAAAAATC TGGGATGATC AATGGATCTT
801    TTGGGTTGGA CCATTCATTG GAGCTGCACT TGCTGCAGTT TACCATCAAA
851    TAATCATCAG AGCCATTCCA TTCCACAAGT CGTCTTAATC TAGA

```

2.4 NtPIP2;1_S118A-Proteinsequenz

1	MSKDVIEEGQ	VHQQHGKDYV	DPPPAPLLDF	AELKLWSFHR	ALIAEFIATL
51	LFLYVTVATV	IGHKKLNGAD	KCDGVGILGI	SWAFGGMIFV	LVYCTAGISG
101	GHINPAVTFG	LFLARKVALL	RAVGYIIAQS	LGAICGVGLV	KGFMKHYYNT
151	LGGGANFVQP	GYNKGTALGA	EIIGTFVLVY	TVFSATDPKR	SARDSHVPVL
201	APLPIGFAVF	MVHLATIPIT	GTGINPARTF	GAAVIYNTEK	IWDDQWIFWV
251	GPFVGALVAA	VYHQYILRGS	AIKALGSFRS	NPTN*	

2.5 NtPIP2;1_S277A-Proteinsequenz

1	MSKDVIEEGQ	VHQQHGKDYV	DPPPAPLLDF	AELKLWSFHR	ALIAEFIATL
51	LFLYVTVATV	IGHKKLNGAD	KCDGVGILGI	SWAFGGMIFV	LVYCTAGISG
101	GHINPAVTFG	LFLARKVSLI	RAVGYIIAQ	LGAICGVGLV	KGFMKHYYNT
151	LGGGANFVQP	GYNKG TALGA	EIIGTFVLVY	TVFSATDPKR	SARDSHVPVL
201	APLPIGFAVF	MVHLATIPIT	GTGINPARSF	GAAVIYNTK	IWDDQWIFWV
251	GPFV GALVAA	VYHQYILRGS	AIKALGA	FRS	NPTN*

2.6 NtPIP2;1_S118/277A-Proteinsequenz

```

1   MSKDVIEEGQ VHQQHGKDYV DPPPAPLLDF AELKLWSFHR ALIAEFIATL
51  LFLYVTVATV IGHKKLNGAD KCDGVGILGI SWAFGGMIFV LVYCTAGISG
101 GHINPAVTFG LFLARKVALL RAVGYIIAQS LGAICGVGLV KGFMKHYYNT
151 LGGGANFVQP GYNKG TALGA EIIGTFVLVY TVFSATDPKR SARDSHVPVL
201 APLPIGFAVF MVHLATIPIT GTGINPARSF GAAVIYNTEK IWDDQWIFWV
251 GPFVGALVAA VYHQYILRGS AIKALGAFRS NPTN*
```

2.7 NtPIP2;1_H196A-Proteinsequenz

```

1   MSKDVIEEGQ VHQQHGKDYV DPPPAPLLDF AELKLWSFHR ALIAEFIATL
51  LFLYVTVATV IGHKKLNGAD KCDGVGILGI SWAFGGMIFV LVYCTAGISG
101 GHINPAVTFG LFLARKVSLR RAVGYIIAQS LGAICGVGLV KGFMKHYYNT
151 LGGGANFVQP GYNKG TALGA EIIGTFVLVY TVFSATDPKR SARDSAVPVL
201 APLPIGFAVF MVHLATIPIT GTGINPARTF GAAVIYNTEK IWDDQWIFWV
251 GPFVGALVAA VYHQYILRGS AIKALGSFRS NPTN*
```

2.8 NtPIP2;1_H196A/S277A-Proteinsequenz

```

1   MSKDVIEEGQ VHQQHGKDYV DPPPAPLLDF AELKLWSFHR ALIAEFIATL
51  LFLYVTVATV IGHKKLNGAD KCDGVGILGI SWAFGGMIFV LVYCTAGISG
101 GHINPAVTFG LFLARKVSLR RAVGYIIAQS LGAICGVGLV KGFMKHYYNT
151 LGGGANFVQP GYNKG TALGA EIIGTFVLVY TVFSATDPKR SARDSAVPVL
201 APLPIGFAVF MVHLATIPIT GTGINPARTF GAAVIYNTEK IWDDQWIFWV
251 GPFVGALVAA VYHQYILRGS AIKALGAFRS NPTN*
```

2.9 NtAQP1_S129A-Proteinsequenz

```

1   MAENKEEDVK LGANKFRETQ PLGTAAQTDK DYKEPPPAPL FEPGELSSWS
51  FYRAGIAEFM ATFLFLYITI LTMGLKRSR SLCSSVGIQG VAWAFGGMIF
101 ALVYCTAGIS GGHINPAVTF GLFLARKLAL TRAIIFYVMQ CLGAICGAGV
151 VKGFMVGPYQ RLGGGANVVN HGYTKGDGLG AEIIGTFVLV YTVFSATDAK
201 RNARDSHVPI LAPLPIGFAV FLVHLATIP I TGTGINPARS LGAAIIYNTD
251 QAWDDHWIFW VGPFIGAALA AVYHQIIRA IPFHKSS*
```

3 Abkürzungsverzeichnis

-xg	-mal Erdbeschleunigung
μ	Mikro
AtPIP2;1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Plasmamembrane Intrinsic Protein 2;1
AQP	Aquaporin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
GFP	englisch: <i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HsAQP1	<i>Homo sapiens</i> Aquaporin 1
l	Liter
m	Meter
M	Molar
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mosm	Milliosmolar
mRNA	englisch: messenger RNA
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NtAQP1	<i>Nicotiana tabacum</i> Aquaporin 1
NtPIP2;1	<i>Nicotiana tabacum</i> Plasmamembrane Intrinsic Protein 2;1
PCMBs	p-Chloromercuribenzolsulphonat
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion
P _f	osmotischer Permeabilitätskoeffizient
PIP	englisch: Plasmamembrane Intrinsic Protein
pmol	Picomol = 10 ⁻¹² Mol
PPFD	engl.: <i>photosynthetic photon flux density</i>
ppm	engl.: <i>parts per million</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	englisch: rounds per minute
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	englisch: Sodium Dodecylsulfate
sec	Sekunde
SoPIP2;1	<i>Spinacia oleracea</i> Plasmamembrane Intrinsic Protein 2;1
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	englisch: Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol.	Volumen

4 Ein-, bzw. Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Publikationsliste

Uehlein, N., Otto, B., Hanson, D., Fischer, M., McDowell, N. and Kaldenhoff, R. (2007). Function of Aquaporins as Chloroplast Gas Pores Challenges The Concept of Membrane CO₂ Permeability. Plant Cell, submitted

Kaldenhoff, R., Fischer, M. (2006) Functional Aquaporin Diversity in Plants. Biochim Biophys Acta, 1758(8), 1134-41

Kaldenhoff, R., Fischer, M. (2006) Aquaporins in Plants. Acta Physiol, 187, 169-176

Präsentationen

Rhein-Main-Kolloquium der Botanischen Institute, Darmstadt 2004. „Expression of *Samanea saman* Aquaporin 2 in Chloroplasts of *Nicotiana tabacum*”

Winter-retreat SFB 628, Hirschegg 2006, Österreich. „Molecular characterization of tobacco aquaporins by stopped flow spectrophotometry”

Posterpräsentationen

17. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen 2004. „Expression of *Samanea saman* Aquaporin 2 in Chloroplasts of *Nicotiana tabacum*”

4th International Conference on Aquaporins, Genval (Brussels) 2005, „Functional characterization of tobacco aquaporins and their interaction”

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Matthias Fischer
Geburtsdatum	19.04.1977
Geburtsort	Freiburg i. Breisgau
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulausbildung:

1983 – 1987	Hellweg-Grundschule, Dortmund
1987 – 1996	Geschwister-Scholl-Gesamtschule, Dortmund
Juni 1996	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1996 – 1997	„Haltestelle e.V.“, Tagesstätte für psychisch Kranke, Dortmund
-------------	--

Hochschulstudium:

1997 – 2003	Studium der Biologie mit Hauptfach Biotechnologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2002 – 2003	Diplomarbeit mit dem Thema „Transformation pflanzlicher Aquaporine in Chloroplasten“ am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik bei Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff, Julius von Sachs-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg
2003	Abschluss als Diplom-Biologe

Promotion:

2003 – 2007	Promotionsstudium bei Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff am Lehrstuhl für Angewandte Pflanzenwissenschaften der Technischen Universität Darmstadt. Anstellung als Wissenschaftlicher Mitarbeiter
-------------	---

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Darmstadt, Oktober 2007

.....